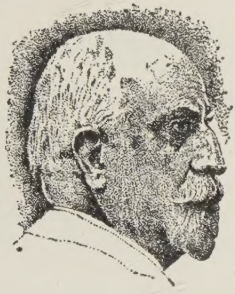
VOLUMEN 8 ABRIL-JUNIO 1955 NUM. 2

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

COMMONWEALTH MYCOLOGI
28 MAR 19

SUMARIO

Página

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

Obtención de antígenos y sueros hiperinmunes de las encefalitis de San Luis, Japonesa B, Equinas Este y Oeste y ensayos de fijación de complemento con los mismos. II, por **A. P. García Gancedo** 101

Descripción de las inclusiones intracelulares producidas por el virus «Broad-bean Mottle», por **Miguel Rubio Huertos** y **D. H. M. Van Slogteren** 133

Contribución al estudio de levaduras salvajes y cultivadas de la microflora española (continuación), por **Enrique Feduchy Mariño** 137

Nueva especie de levadura aislada de líquido curtiente: Saccharomyces Chambardi, nov. sp., por **Carlos Ramírez Gómez** y **Jacques Boidin** 225

SE SUPLICA EL CAMBIO
ON PRIE L'ECHANGE
AUSTAUSCH ERWUNSCHT
EXCHANGE DESIRED

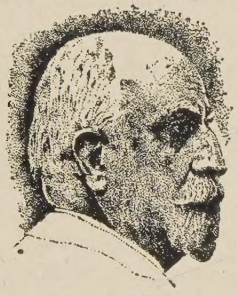
TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
SERRANO, 113 ó 144 - MADRID - (ESPAÑA)

Número suelto: 22 pesetas. **Suscripción anual (4 números): 80 pesetas.**

VOLUMEN 8 ABRIL-JUNIO 1955 NUM. 2

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. don Arnaldo Socías Amorós, Director del Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología, del C. S. I. C.

Prof. Dr. don Lorenzo Vilas López, Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. don Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Gráficas TEJARIO, S. A. Pza. del Biombo, 4.-Tel. 22 12 88-Madrid

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE VIRUS

OBTENCION DE ANTIGENOS Y SUEROS HIPERINMUNES DE LAS ENCEFALITIS DE SAN LUIS, JAPONESA B, EQUINAS ESTE Y OESTE Y ENSAYOS DE FIJACION DE COMPLEMENTO CON LOS MISMOS. II (*)

por
A. P. García Gancedo.

TITULACION DE SUEROS

Es un hecho de todos conocido, que cuanto más tiempo permanezcan en incubación las mezclas de suero antígeno y complemento, es fijado más complemento por una cantidad determinada de anticuerpo, y que los factores temperatura y tiempo deterioran espontáneamente el complemento lentamente a temperaturas bajas (0° a 5° C.) y rápidamente a temperaturas superiores a 30° C. Igualmente se ha comprobado que la reacción de fijación de complemento es más sensible en frío que en caliente, si bien la acción anticomplementaria de suero y antígeno es más pronunciada después de dieciocho horas en nevera que en una en baño-maría a 37° C. Este inconveniente queda eliminado utilizando antígenos que no tengan propiedades anticomplementarias.

En los ensayos de fijación de complemento efectuados para la titulación de nuestros sueros hemos seguido la técnica siguiente: En una serie de tubos se colocan diluciones de suero inactivado del 1/1 al 1/256, en volumen de 0,20 c. c.; seguidamente se añade a cada tubo 0,20 c. c. del complemento diluído de manera que contenga dos unidades y 0,20 c. c. de la dilución de antígeno. Agitada la gradilla, se coloca en la nevera, donde permanecerá de dieciséis a dieciocho horas. Todos los componentes de esta parte de la reacción deben mantenerse fríos durante las manipulaciones.

(*) Trabajo realizado bajo la dirección del Dr. E. Gallardo, Jefe de la Sección de Virus.

A la mañana siguiente, separada la gradilla de la nevera, se incuba durante media hora en bañomaría a 37° C., después de haber añadido 0,40 c. c. del sistema hemolítico preparado quince minutos antes.

El sistema hemolítico se prepara con partes iguales de una suspensión de eritrocitos de carnero lavados, al 2 por 100 en solución salina, y una dilución de hemolisina que contenga dos unidades hemolíticas en 0,20 c. c.

De esta mezcla se añade a cada tubo 0,40 c. c., y después de la media hora de incubación a 37° C. se procede a leer los resultados, que serán anotadas con los números 4-3-2-1-0 y el signo ±. El número 4 indica fijación total; el número 0, hemolisis total y los demás números y el signo ± indican diversos grados de fijación.

El título del suero será aquel que dé al menos 2 de fijación a la dilución más alta.

Nuestros ensayos de fijación de complemento se efectuaron en volumen total de 1 c. c. por tubo, con dos unidades de complemento.

Al mismo tiempo se verificaban los siguientes controles:

Control de suero.—Contiene las diluciones más bajas de suero, más dos unidades de complemento, más el sistema hemolítico, sustituyendo al antígeno con solución salina.

Control del antígeno y del sistema hemolítico.—Consiste en una serie de cuatro tubos conteniendo 0,05, 0,10, 0,15 y 0,20 c.c. de la dilución del complemento usado en la prueba; o sea, media, una, una y media, dos unidades. Completado el volumen en cada tubo hasta 0,40 c. c. con solución salina, se añade a cada uno 0,20 c. c. de antígeno, no agregándoseles suero. Luego se les agrega el sistema hemolítico en la cantidad de 0,40 c. c.

Como es natural, los controles son sometidos a las mismas incubaciones que la prueba de fijación de complemento, y pondrán de manifiesto toda reacción anticomplementaria que haya ocurrido en la primera fase de incubación en nevera.

Sueros de la encefalitis de San Luis.

Los sueros 1 y 2 se titularon en presencia del antígeno a la dilución 1/1 y 2/1 con resultado negativo.

Los restantes sueros se titularon con el antígeno de la dilución 1/1, re-

sultando: Suero 3, título 0; suero 4, título 1/4; suero 5, título 1/8; y suero 6, título 1/4. (Véanse los cuadros correspondientes.)

Sueros de la encefalitis Japonesa B,

Los sueros 1, 2, 3 y 4, titulados en presencia del antígeno a la dilución 1/2, dieron el siguiente resultado: Suero 1, título 0; suero 2, título 1/2; suero 3, título 0; y suero 4, título 0.

Los mismos sueros con el antígeno a la dilución 1/1, dan un título de 1/256 en los sueros 1 y 2, y de 0 en los 3 y 4.

Y dichos sueros con el antígeno a la dilución 2/1, no modifican el título alcanzado en la anterior titulación.

Los restantes sueros se titularon con el antígeno a la dilución 1/1 con los resultados siguientes: Suero 5, título 0; suero 6, título 1/1; suero 7, título 1/8; suero 8, título 1/32; suero 9, título 1/64; suero 10, título 1/16, y suero 11, título 1/16. (Véanse los cuadros conrrespondientes.)

Sueros de la encefalitis equina Este.

El suero 1 no se tituló, por haberse utilizado totalmente en pruebas de neutralización, independientes a este trabajo.

Los sueros 2 y 3 se han titulado con antígeno a la dilución 1/4, resultando: Suero 2 título 0; suero 3, título 1/8.

Los sueros 4, 5, 6, 7 y 8, con antígeno al 1/2, obteniéndose: Suero 4, título 0; suero 5, título 0; suero 6, título 0; suero 7, título 1/4, y suero 8, título 0.

Y los sueros 9 y 10 con antígeno al 1/1, dando los siguientes títulos: Suero 9, título 1/128, y suero 10, título 1/64. (Véanse los cuadros correspondientes.)

Sueros de la encefalitis equina Oeste.

Los sueros 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 8 se titularon con el antígeno a la dilución1/4 y se obtuvo: Suero 1, título 0; suero 2, título 0; suero 3, título 0; suero 4, título 1/128; suero 6, título 1/256; suero 7, título 1/32; y suero 8, título 1/64.

Y los sueros 5 y 9 con el antígeno al 1/2 dieron: Suero 5, título 1/32; y suero 9, título 1/16. (Véanse los cuadros correspondientes.)

TITULACION DE SUEROS

ENCEFALITIS DE SAN LUIS — SUERO N.º 1

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
S. LUIS 2/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 0.

ENCEFALITIS DE SAN LUIS — SUERO N.º 2

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
S. LUIS 2/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 0.

ENCEFALITIS DE SAN LUIS — SUERO N.º 3

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
S. LUIS 1/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 0.

ENCEFALITIS DE SAN LUIS — SUERO N.º 4

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
S. LUIS 1/1	3	2	2	1	±	0	0	0	0

Título del suero: 1/4.

ENCEFALITIS DE SAN LUIS — SUERO N.º 5

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
S. LUIS 1/1	4	3	2	2	1	±	0	0	0

Título del suero: 1/8.

ENCEFALITIS DE SAN LUIS — SUERO N. 6

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
S. LUIS 1/1	3	2	2	1	±	0	0	0	0

Título del suero: 1/4.

ENCEFALITIS JAPONESA B — SUERO N.º 1

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
JAPON 1/1	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Título del suero: 1/256.

ENCEFALITIS JAPONESA B — SUERO N.º 2

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
JAPON 1/1	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Título del suero: 1/256.

ENCEFALITIS JAPONESA B — SUERO N.º 3

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
JAPON 2/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 0.

ENCEFALITIS JAPONESA B — SUERO N.º 4

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
JAPON 2/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 0.

ENCEFALITIS JAPONESA B — SUERO N.º 5

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
JAPON 1/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 0.

ENCEFALITIS JAPONESA B — SUERO N.º 6

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
JAPON 1/1	2	0	0	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 1/1.

ENCEFALITIS JAPONESA B — SUERO N.º 7

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
JAPON 1/1	4	3	2	2	±	0	0	0	0

Título del suero: 1/8.

ENCEFALITIS JAPONESA B — SUERO N.º 8

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
JAPON 1/1	4	4	4	4	3	2	0	0	0

Título del suero: 1/32.

ENCEFALITIS JAPONESA B — SUERO N.º 9

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
JAPON 1/1	4	4	4	4	4	3	2	0	0

Título del suero: 1/64.

ENCEFALITIS JAPONESA B — SUERO N.º 10

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
JAPON 1/1	4	4	4	3	2	0	0	0	0

Título del suero: 1/16.

ENCEFALITIS JAPONESA B — SUERO N.º 11

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
JAPON 1/1	4	4	4	3	2	0	0	0	0

Título del suero: 1/16.

ENCEFALITIS EQUINA ESTE — SUERO N.º 2

Antígeno	Diluciones del suero							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
ESTE 1/4	0	0	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 0.

ENCEFALITIS EQUINA ESTE — SUERO N.º 3

Antígeno	Diluciones del suero							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
ESTE 1/4	4	3	2	0	0	0	0	0

Título del suero: 1/8.

ENCEFALITIS EQUINA ESTE — SUERO N.º 4

Antígeno	Diluciones del suero							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
ESTE 1/2	0	0	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 0.

ENCEFALITIS EQUINA ESTE — SUERO N.º 5

Antígeno	Diluciones del suero							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
ESTE 1/2	0	0	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 0.

ENCEFALITIS EQUINA ESTE — SUERO N.° 6

Antígeno	Diluciones del suero							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
ESTE 1/2	1	±	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 0.

ENCEFALITIS EQUINA ESTE — SUERO N.° 7

Antígeno	Diluciones del suero							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
ESTE 1/2	3	2	1	0	0	0	0	0

Título del suero: 1/4.

ENCEFALITIS EQUINA ESTE — SUERO N.° 8

Antígeno	Diluciones del suero							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
ESTE 1/2	1	±	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 0.

ENCEFALITIS EQUINA ESTE — SUERO N.º 9

Antígeno	Diluciones del suero							
	1/1	1/2	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
ESTE 1/1	4	4	4	4	3	3	2	0

Título del suero: 1/128.

ENCEFALITIS EQUINA ESTE — SUERO N.º 10

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
ESTE 1/1	4	4	4	4	3	3	2	0	0

Título del suero: 1/64.

ENCEFALITIS EQUINA OESTE — SUERO N.º 1

Antígeno	Diluciones del suero							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
OESTE 1/4	0	0	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 0.

ENCEFALITIS EQUINA OESTE — SUERO N.° 2

Antígeno	Diluciones del suero							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
OESTE 1/4	0	0	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 0.

ENCEFALITIS EQUINA OESTE — SUERO N.° 3

Antígeno	Diluciones del suero							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
OESTE 1/4	0	0	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 0.

ENCEFALITIS EQUINA OESTE — SUERO N.° 4

Antígeno	Diluciones del suero							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
OESTE 1/4	4	4	3	3	2	2	2	0

Título del suero: 1/128.

ENCEFALITIS EQUINA OESTE — SUERO N.º 5

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
OESTE 1/2	4	4	4	4	3	2	0	0	0

Título del suero: 1/32.

ENCEFALITIS EQUINA OESTE — SUERO N.º 6

Antígeno	Diluciones del suero							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
OESTE 1/4	4	4	4	4	3	3	2	2

Título del suero: 1/256.

ENCEFALITIS EQUINA OESTE — SUERO N.º 7

Antígeno	Diluciones del suero							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
OESTE 1/4	4	4	3	2	2	1	0	0

Título del suero: 1/32.

ENCEFALITIS EQUINA OESTE — SUERO N.º 8

Antígeno	Diluciones del suero							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
OESTE 1/4	4	4	3	3	3	2	1	0

Título del suero: 1/64.

ENCEFALITIS EQUINA OESTE — SUERO N.º 9

Antígeno	Diluciones del suero								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
OESTE 1/2	3	3	3	2	2	1	±	0	0

Título del suero: 1/16.

OBTENCION DE ANTIGENOS

Preparación de antígenos encefalíticos.

Como es sabido, los llamados virus neurotropos se fijan y multiplican preferentemente en las células del sistema nervioso central, siendo como consecuencia de ello los tejidos cerebral y medular los más ricos en virus. Tales virus pueden hallarse también en otros tejidos, si bien no en la proporción requerida para la preparación de antígenos, con la sola excepción del de la Coriomeningitis linfocitaria, que, en las infecciones experimentales de los cobayos, evidencia gran cantidad de virus en los bazos de los animales moribundos.

También los tejidos embrionarios de pollo, infectados con los virus equinos Este y Oeste son ricos en virus.

Dos tipos de antígenos encefalíticos de cerebros de ratón son los generalmente aceptados por los investigadores; los virulentos, con los peligros inherentes al uso de material infeccioso y los avirulentos que, bien preparados, suprimen el peligro de contagio, sin pérdida de antigenicidad.

Antígenos virulentos.

Métodos de centrifugación.—P. Walter y sus colaboradores, utilizando la centrifugación a una velocidad relativamente alta, 10 a 15.000 r. p. m., separan de las suspensiones de tejido cerebral el material anticomplementario y las substancias que dan lugar a las reacciones inespecíficas en los ensayos de fijación de complemento. El modo de operar es el siguiente: Cerebros de ratones infectados con un virus determinado, se pesan y trituran en mortero sin abrasivo, añadiendo lentamente solución salina con 1 por 100 de suero normal inactivado de la misma especie animal hasta conseguir una fina suspensión al 10 por 100. De esta suspensión se separan las partículas de mayor tamaño mediante una centrifugación a 1.500 r. p. m. durante diez minutos. El líquido sobrenadante, ligeramente opalescente, se centrifuga a 6.500 r. p. m., en tubos de plástico tapados, durante veinte minutos. Separado nuevamente el líquido de los materiales sedimentados, se practica una intensa y última centrifugación a 12.400 r. p. m. durante una hora. El líquido sobrenadante, transparente o débilmente teñido de hemoglobina, rico en virus activo, constituye el antígeno. Para su conservación se añade un antiséptico que no modifique sus propiedades antigénicas (borato de fenil mercurio, mertiolato, etc.), y seguidamente se reparte en cantidades de 2 a 5 c. c. en ampollas, se deseca en congelación (liofilización) y, una vez cerradas, se almacenan en nevera. Cuando se necesitan para su uso, se añade agua destilada hasta su volumen primitivo. El título de los antígenos virulentos desecados suele ser de 1/8 y sus propiedades específicas se mantienen durante largo tiempo.

Otro método consiste en someter las suspensiones virulentas a una centrifugación de 10.000 a 30.000 r. p. m. durante una hora, filtrando el líquido sobrenadante por filtro Seitz. Los antígenos así obtenidos no

tienen poder anticomplementario, pero la filtración reduce su antigenicidad en grado muy apreciable o totalmente, razón por la cual no es técnica recomendable.

Casals y Palacios, en modificaciones sucesivas, mejoran y simplifican las manipulaciones para la obtención de antígenos virulentos por centrifugación. Parten de cerebros frescos de ratón triturados en mortero sin abrasivo, que colocan en suspensión al 10 por 100 en solución salina con suero normal de la misma especie. Sometida la suspensión a una centrifugación de 5.000 r. p. m. durante veinte minutos, separan el líquido sobrenadante que contiene el antígeno. Esta única centrifugación es suficiente para eliminar los materiales anticomplementarios y las substancias que dan lugar a las reacciones inespecíficas. Su conservación y almacenamiento se verifican en la forma ya descrita.

Antígenos avirulentos.

Los antígenos virulentos pueden ser transformados en avirulentos sin que pierdan su poder antigénico de modo apreciable. Para ello se han ensayado distintos métodos.

La inactivación con formalina o por el calor no fué satisfactoria; la formalina los hace anticomplementarios y el calor destruye su antigenicidad.

La luz ultravioleta es un método de inactivación muy recomendable. Si se utiliza como fuente de luz la lámpara de vapor de mercurio de Hanovia, los antígenos se colocarán en frascos o ampollas de cuarzo antes de la adición del antiséptico, y se agitan únicamente durante la irradiación. El tiempo necesario para la transformación de cada antígeno se determina por inoculación intracerebral en ratones de diversas muestras de los antígenos.

Casals perfeccionó este método sometiendo el líquido sobrenadante a la centrifugación, repartido en frascos o ampollas y liofilizado, a la irradiación con luz ultravioleta. Según él, las suspensiones de los virus Este, Oeste, Rabia, Coriomeningitis y San Luis, expuestas a la luz ultravioleta, no alteran sus propiedades fijadoras del complemento específicas, no adquieren poder anticomplementario ni modifican su título antigénico.

Nuestro proceder

Para la obtención de los antígenos correspondientes a las encefalitis de San Luis, Japonesa B, equina Este y equina Oeste, nos hemos atenido a la pauta seguida por W. McD. Hammon y C. España: 1.º Los cerebros de un grupo de ratones muertos o sacrificados de encefalitis experimental, se trituran finamente en un mortero sin abrasivo, agregando después, poco a poco, agua bidestilada en cantidad suficiente para que la suspensión quede al 1/20. 2.º El producto así obtenido se reparte en cantidades de 10 c. c. en ampollas de 40 c. c. e inmediatamente se liofiliza intensamente (doce a catorce horas). 3.º A cada ampolla liofilizada se añaden dos volúmenes de benceno purísimo (20 c. c.) y después de dos o tres

Inoculado intracerebralmente con encefalitis Japonesa B. Suspensión de cerebro al 1/10. Fase paralítica.

horas de contacto se filtra por placa de Jena y vacío. 4.º Esta operación se repite dos veces más, con un volumen de benceno (10 c. c.) y media hora de contacto. 5.º Libre la substancia cerebral del benceno por la filtración efectuada, se deposita en un mortero con una pequeña cantidad de solución salina, suficiente para empapar, durante una hora; se tri-

tura y se añade lentamente solución salina hasta completar el volumen original (10 c. c.). 6.º La suspensión resultante se centrifuga durante cuarenta y cinco minutos a 10.000 r. p. m., o bien veinte o treinta minutos a 15.000 r. p. m., retirando seguidamente el líquido sobrenadante que es el antígeno. 7.º Añadido mertiolato o borato de fenil mercurio en cantidad para que quede éste al 1/10.000, se reparte en ampollas y se liofiliza para su conservación.

Durante las primeras manipulaciones se trabajará con las máximas precauciones, con el fin de evitar un posible contagio.

El repetido contacto con el benceno, además de desposeer al material liofilizado de su virulencia sin pérdida de su carácter antigénico, destruye el poder anticomplementario, que parece ser debido, según De Boer y Cox, a los lipoides.

La técnica descrita proporciona antígenos sin el más mínimo poder anticomplementario, que generalmente pueden ser diluídos (en solución salina) hasta el 1/4.

Nosotros hemos obtenido un solo antígeno de la encefalitis de San Luis y dos de la Japonesa B, equina Este y equina Oeste. Con ellos hemos practicado todos los ensayos de fijación de complemento para valorar nuestros sueros en diluciones 2/1, 1/1, 1/2, 1/4 con resultados satisfactorios. (Véanse los cuadros de titulación de sueros.)

Determinación del poder anticomplementario de los antígenos.

En tres series de tubos con ocho tubos cada una se depositan, mediante pipeta calibrada, cantidades de 0,05, 0,08, 0,10, 0,12, 0,14, 0,16, 0,18 y 0,20 c. c. de complemento previamente titulado. En dos series de tubos se ponen 0,20 c. c. del antígeno a probar. En la serie que queda, en lugar del antígeno se añade 0,20 c. c. de solución salina. Una de las series se coloca en bañomaría a 37º C. durante una hora, junto con la que contiene solución salina, que actúa como control. La otra serie se coloca en nevera durante dieciséis o dieciocho horas, sometiéndola después también al bañomaría. Después de esta incubación a 37º C., a los tubos que contienen todos 0,60 c. c., ya que se les ha añadido a cada uno cantidad suficiente de solución salina hasta completar dicho volumen, agregamos a dichos tubos 0,40 c. c. de células sensibilizadas preparadas quince minutos antes y se incuba otra media hora a 37º C. Se anota la

reacción y se determina la cantidad menor de complemento diluído, que dió hemolisis completa.

Hemos observado que todos los antígenos que se han obtenido carecen de poder anticomplementario.

Aunque el primer tubo de cada serie (véanse cuadros) presenta en todas las determinaciones fijación parcial, esto también ocurre en el primer tubo de los controles, y es debido a que contienen una cantidad insuficiente de complemento (0.05 c. c.).

ENCEFALITIS DE SAN LUIS — ANTÍGENO N.º 1

Se parte de cerebro de ratón del Pase I

Animales inoculados	Número	Vía de inoculación	Suspensión del virus	Cantidad inoculada	Resultados
Ratones	10	Intracerebral	1/10	0,03 c. c.	Se sacrifican 9 a los cinco días y uno a los seis.

ENCEFALITIS JAPONESA B — ANTÍGENO N.º 1

Se parte de cerebro de ratón del Pase I

Animales inoculados	Número	Vía de inoculación	Suspensión del virus	Cantidad inoculada	Resultados
Ratones	10	Intracerebral	1/10	0,03 c. c.	Mueren a los cinco días dos. Sacrificados a los seis días seis. Sacrificados a los siete días dos.

ENCEFALITIS JAPONESA B

ANTÍGENO N.º 2

Se parte de cerebro de ratón del Pase III

Animales inoculados	Número	Vía de inoculación	Suspensión del virus	Cantidad inoculada	Resultados
Ratones	10	Intracerebral	1/10	0,03 c. c.	Muere a las 24 horas 1 (*). Mueren a los seis días 3. Sacrificados a los seis días 6.

(*) Se desecha.

ENCEFALITIS EQUINA ESTE

ANTÍGENO N.º 1

Se parte de cerebro de ratón del Pase I

Animales inoculados	Número	Vía de inoculación	Suspensión del virus	Cantidad inoculada	Resultados
Ratones	12	Intracerebral	1/10.000	0.03 c. c.	Se sacrifican entre las 82 y 86 horas.

ENCEFALITIS EQUINA ESTE — ANTÍGENO N.º 2

Se parte de cerebro de ratón del Pase I

Animales inoculados	Número	Vía de inoculación	Suspensión del virus	Cantidad inoculada	Resultados
Ratones	12	Intracerebral	1/10.000	0,03 c. c.	Se sacrifican entre las 48 y 60 horas.

ENCEFALITIS EQUINA OESTE — ANTÍGENO N.º 1

Se parte de cerebro de ratón del Pase I

Animales inoculados	Número	Vía de inoculación	Suspensión del virus	Cantidad inoculada	Resultados
Ratones	13	Intracerebral	1/30	0,03 c. c.	Se sacrifican a los 4 días.

Se parte de cerebro de ratón del Pase II

Animales inoculados	Número	Vía de inoculación	Suspensión del virus	Cantidad inoculada	Resultados
Ratones	7	Intracerebral	1/1.000	0,03 c. c.	Mueren a los 4 días dos. Mueren a los 6 días dos. Sacrificados a los 6 días tres.

DETERMINACIÓN DEL PODER ANTICOMPLEMENTARIO
ANTÍGENO DE LA ENCEFALITIS DE SAN LUIS

Tubos	Complemento al 1/30	Antígeno sin diluir	Solución salina.	Mezcla hemolítica	Resultados
1	0,05 c. c.	0.20 c. c.	0,35 c. c.	0,40 c. c.	3
2	0,08	"	0,32	"	0
3	0,10	"	0,30	"	0
4	0,12	"	0,28	"	0
5	0,14	"	0,26	"	0
6	0,16	"	0,24	"	0
7	0,18	"	0,22	"	0
8	0,20	"	0,20	"	0

Título del complemento: 0,08 c. c.
0: Hemolisis completa.
0: Fijación parcial.

ANTÍGENO DE LA ENCEFALITIS JAPONESA B. N.º 2

Tubos	Complemento al 1/30	Antígeno sin diluir	Solución salina	Mezcla hemolítica	Resultados
1	0,05 c. c.	0,20 c. c	0,35 c. c.	0,40 c. c.	2
2	0,08 "	" "	0,32 "	" "	0
3	0,10 "	" "	0,30 "	" "	0
4	0,12 "	" "	0,28 "	" "	0
5	0,14 "	" "	0,26 "	" "	0
6	0,16 "	" "	0,24 "	" "	0
7	0,18 "	" "	0,22 "	" "	0
8	0,20 "	" "	0,20 "	" "	0

Título del complemento: 0,08 c. c.

DETERMINACIÓN DEL PODER ANTICOMPLEMENTARIO

ANTÍGENO DE LA ENCEFALITIS EQUINA ESTE. N.º 1

Tubos	Complemento al 1/30	Antígeno sin diluir	Solución salina	Mezcla hemolítica	Resultados
1	0,05 c. c.	0,20 c. c.	0,35 c. c.	0,40 c. c.	1
2	0,08 "	" "	0,32 "	" "	0
3	0,10 "	" "	0,30 "	" "	0
4	0,12 "	" "	0,28 "	" "	0
5	0,14 "	" "	0,26 "	" "	0
6	0,16 "	" "	0,24 "	" "	0
7	0,18 "	" "	0,22 "	" "	0
8	0,20 "	" "	0,20 "	" "	0

Título del complemento: 0,08 c. c.

ANTÍGENO DE LA ENCEFALITIS EQUINA ESTE. N.º 2

Tubos	Complemento al 1/30	Antígeno sin diluir	Solución salina	Mezcla hemolítica	Resultados
1	0,05 c. c.	0,20 c. c.	0,35 c. c.	0,40 c. c.	3
2	0,08 "	" "	0,32 "	" "	1
3	0,10 "	" "	0,30 "	" "	0
4	0,12 "	" "	0,28 "	" "	0
5	0,14 "	" "	0,26 "	" "	0
6	0,16 "	" "	0,24 "	" "	0
7	0,18 "	" "	0,22 "	" "	0
8	0,20 "	" "	0,20 "	" "	0

Título del complemento: 0,10 c. c.

DETERMINACIÓN DEL PODER ANTICOMPLEMENTARIO

ANTÍGENO DE LA ENCEFALITIS EQUINA OESTE. N.º 1

Tubos	Complemento al 1/30	Antígeno sin diluir	Solución salina	Mezcla hemolítica	Resultados
1	0,05 c. c.	0,20 c. c.	0,35 c. c.	0,40 c. c.	1
2	0,08 "	" "	0,32 "	" "	0
3	0,10 "	" "	0,30 "	" "	0
4	0,12 "	" "	0,28 "	" "	0
5	0,14 "	" "	0,26 "	" "	0
6	0,16 "	" "	0,24 "	" "	0
7	0,18 "	" "	0,22 "	" "	0
8	0,20 "	" "	0,20 "	" "	0

Título del complemento: 0,08 c. c.

ANTÍGENO DE LA ENCEFALITIS EQUINA OESTE. N.º 2

Tubos	Complemento al 1/30	Antígeno sin diluir	Solución salina	Mezcla hemolítica	Resultados
1	0,05 c. c.	0,20 c. c.	0,35 c. c.	0,40 c. c.	1
2	0,08 "	" "	0,32 "	" "	0
3	0,10 "	" "	0,30 "	" "	0
4	0,12 "	" "	0,28 "	" "	0
5	0,14 "	" "	0,26 "	" "	0
6	0,16 "	" "	0,24 "	" "	0
7	0,18 "	" "	0,22 "	" "	0
8	0,20 "	" "	0,20 "	" "	0

Título del complemento: 0,08 c. c.

DETERMINACIÓN DEL PODER ANTICOMPLEMENTARIO

ANTÍGENO DE LA ENCEFALITIS EQUINA OESTE N.º 1 (2.ª PRUEBA)

Tubos	Complemento al 1/30	Antígeno sin diluir	Solución salina	Mezcla hemolítica	Resultados
1	0,05 c. c.	0,20 c. c.	0,35 c. c.	0,40 c. c.	3
2	0,08 "	" "	0,32 "	" "	0
3	0,10 "	" "	0,30 "	" "	0
4	0,12 "	" "	0,28 "	" "	0
5	0,14 "	" "	0,26 "	" "	0
6	0,16 "	" "	0,24 "	" "	0
7	0,18 "	" "	0,22 "	" "	0
8	0,20 "	" "	0,20 "	" "	0

Título del complemento: 0,08 c. c.

TITULACION DE ANTIGENOS

Se verifica siguiendo la misma pauta que en la titulación de los sueros que anteriormente describimos, sustituyendo en ella el antígeno por el suero y éste por el antígeno. Varían también las diluciones empleadas (véanse los cuadros correspondientes).

Hemos realizado las titulaciones utilizando el suero de más alto título disponible en cada caso, obteniendo los resultados siguientes:

Encefalitis de San Luis.—Antígeno n.º 1, título 1/3.

Encefalitis Japonesa B.— Antígeno n.º 1, título 1/2; y antígeno n.º 2, título 1/2.

Encefalitis equina Este.—Antígeno n.º 1, título 1/4, y antígeno n.º 2, título 1/3.

Encefalitis equina Oeste.—Antígeno n.º 1, título 1/4, y antígeno n.º 2, título 1/2.

ENCEFALITIS DE SAN LUIS — ANTÍGENO N.º 1

Se utiliza el suero n.º 5 con título 1/8.

Tubos	Antígeno	Suero	Resultados
1	1/1	1/1	4
2	1/1	1/2	4
3	1/2	1/4	3
4	1/3	1/8	2
5	1/4	1/16	1
6	1/6	1/64	0
7	1/8	1/32	0
8	1/10	1/128	0

Título del antígeno: 1/3.

ENCEFALITIS JAPONESA B — ANTÍGENO N.º 1

Se utiliza el suero n.º 2 con título 1/128.

Tubos	Antígeno	Suero	Resultados
1	1/1	1/1	4
2	1/1	1/2	3
3	1/2	1/4	2
4	1/3	1/8	±
5	1/4	1/16	0
6	1/6	1/32	0
7	1/8	1/64	0
8	1/10	1/128	0

Título del antígeno: 1/2.

ENCEFALITIS JAPONESA B — ANTÍGENO N.º 2

Se utiliza el suero n.º 2 con título 1/128.

Tubos	Antígeno	Suero	Resultados
1	1/1	1/1	4
2	1/1	1/2	3
3	1/2	1/4	2
4	1/3	1/8	1
5	1/4	1/16	0
6	1/6	1/32	0
7	1/8	1/64	0
8	1/10	1/128	0

Título del antígeno: 1/2.

ENCEFALITIS EQUINA ESTE — ANTÍGENO N.º 1

Se utiliza el suero n.º 9 con título 1/128.

Tubos	Antígeno	Suero	Resultados
1	1/1	1/1	4
2	1/1	1/2	4
3	1/2	1/3	4
4	1/3	1/8	3
5	1/4	1/16	2
6	1/6	1/32	1
7	1/8	1/64	0
8	1/10	1/128	0

Título del antígeno: 1/4.

ENCEFALITIS EQUINA OESTE — ANTÍGENO N.º 1

Se utiliza el suero n.º 4 con título 1/128.

Tubos	Antígeno	Suero	Resultados
1	1/1	1/1	4
2	1/1	1/2	4
3	1/2	1/4	4
4	1/3	1/8	3
5	1/4	1/16	2
6	1/6	1/32	1
7	1/8	1/64	0
8	1/10	1/128	0

Título del antígeno: 1/4.

ENCEFALITIS EQUINA ESTE — ANTÍGENO N.º 2

Se utiliza el suero n.º 9 con título 1/128.

Tubos	Antígeno	Suero	Resultados
1	1/1	1/1	4
2	1/1	1/2	4
3	1/2	1/4	3
4	1/3	1/8	2
5	1/4	1/16	1
6	1/6	1/32	0
7	1/8	1/64	0
8	1/10	1/128	0

Título del antígeno: 1/3.

ENCEFALITIS EQUINA OESTE — ANTÍGENO N.º 2

Se utiliza el suero n.º 6 con título 1/256.

Tubos	Antígeno	Suero	Resultados
1	1/1	1/1	4
2	1/1	1/2	3
3	1/2	1/4	2
4	1/3	1/8	1
5	1/4	1/16	0
6	1/6	1/32	0
7	1/8	1/64	0
8	1/10	1/128	0

Título del antígeno: 1/2.

CONCLUSIONES

1.ª La técnica de W. MC. D. Hammon y C. España, de sencilla realización, proporciona antígenos avirulentos fáciles de manejar aun por los más inexpertos.

2.ª Los preparados por nosotros no presentaron poder anticomplementario ni en las más altas concentraciones utilizadas.

3.ª Su sensibilidad específica se manifestó hasta en diluciones al 1/4.

4.ª Todos los sueros hiperinmunes fueron obtenidos en cobayos.

5.ª Las suspensiones virulentas de cerebro de ratón de la encefalitis de San Luis se mostraron muy patógenas para los cobayos, a pesar de lo cual los sueros obtenidos no fueron de alto título.

6.ª Las suspensiones virulentas de cerebro de ratón de la encefalitis Japonesa B fueron bien toleradas y proporcionaron sueros de alto título.

7.ª Con las suspensiones virulentas de cerebro de cobayo de las encefalitis equinas Este y Oeste, los sueros obtenidos fueron de título semejante al conseguido por la mayoría de los investigadores.

8.ª Los sueros de las encefalitis Japonesa B y equina Este y Oeste, obtenidos por nosotros, reúnen por su alto título las condiciones requeridas para ser utilizadas como testigos positivos en los ensayos de fijación de complemento, e igualmente en los de estandardización de antígenos.

9.ª De las experiencias realizadas se deduce la posibilidad de conseguir en nuevos ensayos, sueros hiperinmunes de la encefalitis de San Luis, de título igual al obtenido con la encefalitis Japonesa B.

BIBLIOGRAFIA

ADAMSON, J. D., and DUBO, S.—1942. Cand. Pub. Health Jour. 33, 259.

CALMETTE, A., BOQUET, A., et NEGRE, L.—1933. Manual technique de microbiologie et sérologie. 3 édit., Paris. Masson et Cie.

CASALS, J.—1942. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 49, 501.

——— 1944. Jour. Exp. Med. 79, 4, 341-359.

CASALS, J., and PALACIOS, R.—1941. Jour. Exp. Med. 74, 409.

CASALS, J., and WEBSTER, L. T.—1944. Jour. Exp. Med. 79, 45.

CASALS, J., and OLITSKY, P. K.—1945. Jour. Exp. Med. 82, 431-443.

CLAVERO, G., y PEREZ GALLARDO, F.—1943. Técnicas de laboratorio. D. G. S.

DE BOER, C., and COX, H. E.—1947. Jour. Inmunol. 55, 193.

ESPAÑA, C., and HAMMON, W., MC. D.—1947. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 66,101.

GALLARDO MARTINEZ, E.—1947. Rev. San. e Hig. Pub. Junio.

——— 1950. Rev. San. e Hig. Pub. Mayo.

HAMMON, W., MC.D.—1945. Clinics. IV, 2, 485.

HAMMON, W., MC.D., and ESPAÑA, C.—1947. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 66, 113.

HAMMON, W., MC.D.—1948. Diagnostic procedures for virus and rickettsial diseases. Publ. Office Am. Pub. Health Assoc.

LEAKE, J. P.—1941. Pub. Health Rep. U. S. P. H. S. 56, 1.902.

ROCA-GARCIA, M.—1944. Jour. Infect. Diss. 75, 160-169.

SILBER, L. A., and SHUBLADZE, A. K.—1945. Rev. Soviet. Med. 2, 339-341.

SMITHBURN, K. C., HADDOW, A. J., and MAHAFFY, A. F.—1946. Jour. Trop. Med. 26, 189-208.

WATSON, D. W., HAVENS, W. P. Jr., GREEN, R. H., LAVIN, J. I., and SMADEL, J. E.—1943. Jour. Exp. Med. 77, 2, 139-153.

C. S. I. C.
INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL
SECCION DE MICROBIOLOGIA DE MADRID

DESCRIPCION DE LAS INCLUSIONES INTRACELULARES PRODUCIDAS POR EL VIRUS «BROAD-BEAN MOTTLE»

por
Miguel Rubio Huertos y D. H. M. Van Slogteren.

Bawden, Chauduri y Kassanis (1) han descrito algunas propiedades de un nuevo virus llamado por ellos «Broad-bean Mottle», que ataca a las leguminosas. Trabajando nosotros con plantas infectadas con este virus, encontramos en ellas inclusiones intracelulares típicas de virosis, y no descritas hasta la fecha.

Las observaciones las hicimos con plantas de Vicia Faba infectadas con el virus «Broad-bean Mottle» (*), arrancando tiras de epidermis y tiñendo con floxina al 0,5 por 100 sin fijar y a veces fijando con carnoy, empleando un microscopio óptico «Leitz» modelo «Ortolux 1953».

Las inclusiones son del tipo amorfo o cuerpos «X», siendo su estructura granular durante el primer y segundo período de su formación, haciéndose vacuoladas más tarde. Su tamaño varía, según el estado de formación, desde pequeños gránulos a cuerpos compactos del tamaño de una vez y media el del núcleo.

La forma de estos cuerpos «X» cambia desde unos agrupamientos granulares poco compactos, a formas ovales o redondeadas compactas, pudiéndose encontrar de una a cinco inclusiones en una sola célula, aunque, normalmente, sólo se encuentra una, casi siempre en contacto con el núcleo (foto núm. 1).

Estas inclusiones se forman a partir de pequeños gránulos, del mismo modo que describió Sheffiel la formación de las producidas por el virus Mosaico Aucuba (2).

(*) El virus "Broad-bean Mottle" nos los envió el Dr. Bawden, a quien damos las gracias.

Las inclusiones se tiñen muy bien con floxina y son bastante resistentes a la desecación, no sufriendo gran daño al ser tocadas con agujas de disección.

Hemos hecho preparaciones para el estudio de estas inclusiones en el microscopio electrónico (*), según la técnica descrita por uno de nosotros (Rubio, 1950) (3), y hemos podido comprobar que las inclusiones están formadas exclusivamente por partículas de virus, dando la impresión de preparaciones de virus purificado (foto núm. 2).

Las partículas de virus son esféricas y aparentemente idénticas en tamaño a las descritas por Bawden y col. (1) en preparaciones de virus purificado.

BIBLIOGRAFIA

(1) **BAWDEN, F. C.; CHAUDHURI, R. P.,** and **KASSANIS, B.**—1951. Some properties of Broad-bean Mottle virus. **Ann. Appl. Biol.** 38 (4): 774-784.

(2) **SHEFFIELD.**—1931. The formation of intracellular inclusions in solanaceous hosts infected with Aucuba Mosaic of tomato. **Ann. Appl. Biol.** 18, 471.

(3) **RUBIO HUERTOS, Miguel.**—1950. Estudios sobre inclusiones intracelulares, producidas por virus, en las plantas. **Microbiología Española** 3, 207-232.

(*) El microscopio electrónico es el Phillips del "Laboratorium voor Bloembollenonderzoek", de Lisse (Holanda), donde hemos realizado este trabajo, y es Jefe de la Sección de Virus el señor D. H. M. Van Slogteren.

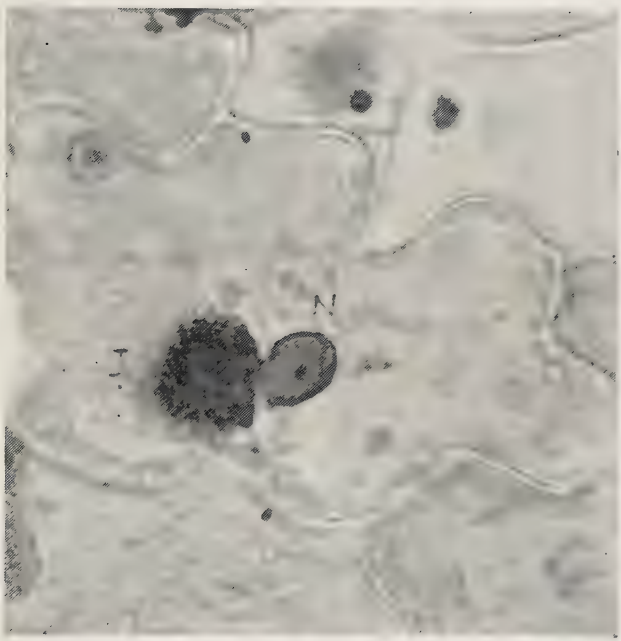


Foto núm. 1.—Célula de Vicia faba *infectada con el virus B. B. M., en la que se observa el núcleo N y una típica inclusión I.*

Foto núm. 2.—Inclusión al microscopio electrónico. Aumento, 40.000.

Foto núm. 3. Igual que la anterior. Aumento, 15.000.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LEVADURAS SALVAJES Y CULTIVADAS DE LA MICROFLORA ESPAÑOLA (continuación)

por
Enrique Feduchy Mariño.

ANTECEDENTES

En la Sección de Levaduras del Instituto de Microbiología General y Aplicada, actualmente Instituto «Jaime Ferrán» de Microbiología, se han seguido varios trabajos que, si bien tenían una íntima relación con el característico de la Sección, formaban parte de los desarrollados en otras Secciones del mismo Instituto, cuya marcha conjunta puede decirse que realizaba un solo y completo trabajo de investigación, bajo la dirección de don Juan Marcilla (q. e. p. d.), nuestro muy querido maestro.

Simultáneamente con estos trabajos, se seguía constantemente una labor de cultivo, aislamiento y clasificación de levaduras, cuya elección estaba influída por las características de dichos trabajos, así: Cuando se estudió la acción de la atmósfera de alcohol en el enriquecimiento en grasa de la levadura, se destacaron algunas tórulas y saccharomyces, que manifestaban sensiblemente esta propiedad.

En los trabajos de multiplicación de levaduras para pienso se destacaron levaduras de los diferentes sustratos empleados como materia prima (jugos de tubérculos diversos, alpechines, prehidrolizados, etc.) (1-2-3-4), en los que espontáneamente se habían desarrollado levaduras o destacando las que dominaban con mejor rendimiento, así como las procedentes de otros medios que fueron también ensayadas en los primeros.

No solamente se destacaron las cepas de aplicación más o menos inmediata; también se siguieron estudios de las que por su aspecto y propiedades acusaban alguna particularidad de interés.

Estos estudios referentes a las distintas cepas no tenían en general relación entre sí, ya que no habían sido guiados con una norma encaminada a un estudio metódico de la «flora» de nuestro país, como se lleva con acertada organización y técnica en el de la «flora» italiana (1). Además, los estudios realizados sobre las diferentes cepas no eran, en general, completos, pues muchos se limitaron solamente a la parte relacionada con el fin para que eran destinados.

Destacadas como de interés muchas de las cepas aludidas, ya sea por el de los estudios de que formaron parte o por sus características y propiedades, se comenzó una publicación de las más interesantes (6-7), publicación que fué interrumpida por el fallecimiento de don Juan Marcilla (q. e. p. d.) y que, siguiendo su norma, hemos continuado.

Entre las cepas elegidas, se presentan unas de fermentación vínica, que hubo ocasión también de ensayar en este Instituto, en la fermentación de mostos desulfitados procedentes de los estudios realizados en la Sección de Fermentaciones Industriales del Patronato «Juan de la Cierva».

Se eligieron unas cepas aisladas del jugo de Asphodelus albus (gamones), que fueron ensayadas como materia prima para la multiplicación de levaduras pienso.

Se destaca una tórula por su granulación característica, que fué elegida por su aspecto, que recuerda a las transformaciones presentadas en sus trabajos por Socías (16) y Schandell (17) sobre la aparición de bacterias procedentes de hongos microscópicos.

También se destaca la Pulchérrima liquefaciens, tantas veces aludida en varios trabajos publicados por D. Juan Marcilla, en los que colaboramos.

Algunas levaduras aisladas del medio ambiente en localidad de abundantes elaboraciones vínicas.

A continuación se comienza la exposición de caracteres y clasificación de la serie de levaduras que, pertenecientes a la colección, han sido elegidas para su publicación.

CANDIDA HUMICOLA VARIEDAD ASPHODELUS

Procedencia.—Esta levadura fué aislada de un jugo procedente de rizomas tuberosos de Asphodelus albus, el que para los estudios realizados por don Juan Marcilla sobre multiplicación de levaduras en sustratos procedentes de materias primas españolas de poco coste (3) fué

elegido por la abundancia grande de dichos rizomas, cuyo jugo azucarado y materias fácilmente sacarificables le hacían indicado para materia prima abundante y económica.

Se realizó un estudio de su flora microbiana espontánea con el fin de aislar levaduras que procedieran de este medio y cuyo fácil y abundante desarrollo en el mismo las destacase como más indicadas, señalando principalmente para la elección las que, además de abundante desarrollo en el medio, no le fermentaban.

Entre las más destacadas figuran la levadura en estudio que se designó con el nombre de Asphodelus.

Es notable en esta levadura la formación de densos velos rugosos con masas colgantes en la cara inferior que frecuentemente se desprenden acumulando en el fondo abundante depósito, tan abundante que en cultivos viejos llegan a ponerse casi en contacto el depósito y el velo, pues este no desaparece mientras existe líquido nutritivo, manteniéndose en actividad, con lo que el aprovechamiento del medio llega al máximo.

Estas destacadas propiedades tan favorables para la elección, con el fin de levadura para multiplicación, la hicieron objeto de un ensayo de multiplicación en medio con aireación forzada, y como sustrato el mismo jugo de Asphodelus. El resultado fué poco satisfactorio, e investigando la causa, se dedujo que al romper continuamente el micelio, y posiblemente también al permanecer sumergido, paralizó su desarrollo.

No por esto se consideró impropia la multiplicación, aunque de primera impresión lo es por este procedimiento, pero se consideró por el contrario muy indicada para multiplicarse en superficie por el procedimiento de cultivo en bandejas, que existe en efecto en las instalaciones alemanas para multiplicación de levaduras alimento.

Estudio de sus características en los diferentes medios de cultivo.

Agua de malta.—A las veinticuatro horas a 25º inicia velo, formado aún, por partículas flotantes que cubren la superficie. También se inicia anillo, formado por partículas adheridas a la pared y depósito. Al microscopio se aprecian células alargadas, algunas algo curvadas, aisladas o reunidas en cadena; otras, más cortas, presentan aspecto elíptico. El contenido celular, liso, con algunos corpúsculos refrigerantes aún no destacados en todas (figs. 1 y 2).

Dimensiones: (2 × 6,4) × (3,8 × 18,2) μ.

A las setenta y dos horas.—El velo está completo, de aspecto denso, rúguso por la carga superior y formado por gruesas partículas colgantes en la cara inferior; éstas caen con facilidad, aumentando el depósito, que comienza a ser abundante. Coloración crema claro.

Al microscopio se aprecian células muy alargadas, unas rectas, otras curvadas o mazudas; también se presèntan formas triangulares y células de menor tamaño y forma elíptica, siendo frecuentes los corpúsculos refringentes pequeños, aislados o colocados en filas en las células alargadas. Se aprecian frecuentes vacuolas.

Un cultivo de cuarenta días presenta en el tubo tan abundante desarrollo que toda la altura del líquido está ocupada por una masa grumosa de aspecto esponjoso, formada por la caída de una serie de gruesos velos. Aún existe velo sin caer, grueso, con masas colgantes de la parte inferior y adherido a la pared formando anillo.

Al microscopio.—Se aprecian células alargadas filiformes, muchas de ellas agrupadas de dos en dos y en mayor número formando cadenas. Otras elípticas aisladas o con una prolongación filiforme nacida de ellas por gemmación, la que al iniciarse da a la célula madre un aspecto deformado (fig. 3).

En el interior de las células se aprecian corpúsculos refrigentes bien definidos en las elípticas y menudas granulaciones en número de uno a dos en muchas de las alargadas.

Medidas: $(3 \times 9{,}3) — (6{,}2 \times 27{,}9)$ µ.

Caracteres de cultivo en mosto de uva peptonado.—Se empleó mosto de uva de 10 Bme, al que se añadió el uno por mil de peptona.

Se sembró con pequeña partícula de velo de cultivo joven.

A las veinticuatro horas de la siembra se había formado velo completo, blanco, finamente rugoso o fibroso, aún agrietado por algunas partes, por no haberse fundido aún los islotes iniciales.

El velo es algo ascendente por las paredes y forma anillo.

Al agitar se precipitan finas partículas pulverulentas que enturbian el líquido.

Al microscopio, preparación en fresco entre porta y cubre con precaución para no dislacerar mucho la partícula, que, tomada junto con una

gota de mosto, permitió apreciar seudomicelios típicos, con ramificaciones aún conservadas (fig. 4).

Esto explicó la variedad de células que aisladas o en cadenas se presentan en el campo y con formas elípticas, alargadas y otras casi filiformes.

Medidas: miden (2,5 — 5) × (5,8 — 10,5).

Las células alargadas forman las ramificaciones y sobre ellas se ven depositadas las más pequeñas, de forma elíptica.

Cultivo de cuatro días.—Velo muy denso y profundamente rugoso, con rugosidades de muy marcado relieve, que da aspecto de una masa de raíces. Anillo ancho y denso. Color blanco, de tono aterciopelado.

Cultivo de treinta días.—Velo formado por espesa masa con aspecto ascendente por la pared. Se desprenden gruesos grumos que van formando muy abundante depósito. Anillo denso. Al microscopio: Células muy alargadas, algunas con aspecto filiforme, aisladas o en cadena. Otras células redondeadas o elíptico-redondeadas, aisladas o también formando cadena de dos a tres células.

Como paso de una a otra forma, se aprecian células redondas o elíptico-redondeadas, con apéndices largos del aspecto de las primeras células.

El contenido celular presenta algunos corpúsculos refringentes.

También aparecen algunas formas celulares de contorno irregular.

Cultivos viejos.—Cultivo de sesenta días, aún presenta velo y las partículas que caen forman ya un depósito de 1 cm. de altura (fig. 5).

En cultivos más viejos, como ya se ha indicado, queda velo, que está ya casi en contacto con la masa del depósito, pues el líquido casi ha desaparecido, parte por evaporación, pero principalmente por el enorme depósito que le empapa.

Agar de malta.—A las cuarenta y ocho horas presenta la estría abundante desarrollo, de aspecto fibroso, como cordoncillo aglutinado, jugoso. Color blanco amarillento, tono céreo.

Al microscopio, células filiformes, delgadas y largas; otras cortas, mazudas, triangulares, etc. Son corpúsculos refringentes.

En la estría de quince días (fig. 8) se aprecian bordes filamentosos.

Estría de sesenta días, presenta tan abundante desarrollo que cubre toda la superficie del agar e invade las paredes del tubo, sobre las que forma arborescencias.

La figura 8 presenta fotografía de colonia gigante sobre agar malta a los veinte días.

Gelatina de malta.—Líquida la gelatina, la colonia gigante sobre este medio comenzó la liquidación a los doce días.

Cultivos sobre agar de mosto.—La estría sobre agar de mosto presenta como la de agar de malta superficie muy rugosa, con aspecto de cordoncillo (fig. 9). A los cinco o seis días se aprecia en los bordes fina vellosidad de micelio sutil y blanco, la coloración del resto de la estría es ligeramente grisácea. En la figura 10 se aprecia el aspecto de la estría a los veinticuatros días.

En las figuras 11, 12 y 13 se aprecia un seudomicelio formado en frotis de agar mosto sobre porta objetos, y en la figura 14 dibujo a la cámara clara después de colocar cubre objetos, como se pudo apreciar.

En la figura 15 se ve fotografía de colonia gigante sobre agar mosto, a los veinte días.

Gelatina de mosto.—El cultivo en picadura sobre gelatina de mosto comenzó a liquidarla francamente a los quince días.

En la 16 se aprecia el aspecto de estría a los diez días.

Cultivo sobre patata.—A las cuarenta y ocho horas formó pátina bien desarrollada, blanco yeso, de aspecto seco y granuloso (fig. 17). Al microscopio, células elípticas y células alargadas, mazudas, deformadas, varias en gemmación, tanto lateral como polar, y la mayoría vacuoladas (fig. 18). Preparación hecha quince días después presenta campo de células redondeadas, con granulaciones refrigerantes y varias vacuoladas (fig. 19).

En cultivo de sesenta días se aprecian formas miceliares de aspectos extraños (figs. 20 y 21).

Sobre agar de patata formó abundante micelio.

Cultivo sobre zanahoria.—Pátina como en patata, blanca, granulada y seca (fig. 22).

Fermentación.—No fermenta ningún azúcar.

Asimilación.—Glucosa +
Galactosa +
Sacarosa +
Maltosa +
Lactosa +

Asimilación de NO_3K = no asimila.

Asimilación de alcohol = débil velo y depósito (fig. 23).

Cultivo en leche = coagulación débil.

Hidrólisis de la arbutina = +.

Los caracteres de la levadura descrita son muy coincidentes con los de la Cándida humícola de Diddens y Lodder, solamente el aspecto morfológico macro y microscópico de los cultivos en diferentes medios, que si bien son coincidentes en varios aspectos, presentan diferencias, las que es posible que existan en un mismo cultivo, por lo variable que es esta levadura, o que se deba a caracteres de una variedad diferente.

Como esto es probable, se ha denominado Cándida humícola, variedad Asphodelo, recordando el medio de donde fué aislada.

LEVADURA N.º 42 C. DEL CATALOGO PROVISIONAL

Procedencia: aislada del aire en Alcázar de San Juan (Ciudad Real) en 5 de marzo de 1945. Caja remitida por el Dr. Morales Musulen. Medio, agar maíz.

Descripción.

Crecimiento en agua de malta a 25.º.—A las cuarenta y ocho horas, velo blanco, membranoso, coherente, de aspecto céreo, en islote cuya formación se inicia por crecimiento en puntos de la superficie del líquido; estos puntos confluyen entre sí, observándose al principio un tenue velo puntuado a modo de finísimo encaje. Cuando se agita el tubo, el velo cae entero, sin romperse ni enturbiar al líquido, que era y permanece transparente. Células esféricas, algunas aovadas, con protoplasma fuertemente granuloso que, en ciertos enfoques, hace que parezcan las células esculpidas, aunque con enfoque correcto se comprueba que se trata de muchos y pequeños corpúsculos de grasa, coloreables por

el Sudán III. Algunas células con vacuola. Gemación casi siempre única, en algunas células doble (ver microfotografía y dibujo en figuras 24 y 25). Dimensiones de las células (5-7) × (5-12). Medias (5,5 × 7).

A los cuatro días.—Líquido transparente. Velo blanco, de aspecto céreo brillante, con bordes algo deshilachados. No hay anillo todavía. El velo, por su parte inferior, no es liso y por ligera agitación del tubo se desprenden flóculos del velo que caen al fondo. Cuando se agita el tubo con mayor brusquedad el velo cae, y en parte se disgrega, enturbiándose el líquido temporalmente, pues en días sucesivos vuelve a formarse velo; parte de las células quedan en el fondo y el líquido recobra su transparencia. Células de aspecto análogo a las descritas anteriormente, aunque se observan algunas (pocas) de tamaño bastante mayor, esférica o con frecuencia aovadas (ver el dibujo en figura 26).

A los siete días.—Igual aspecto de los cultivos. Células esféricas con uno o con dos o mayor número de gruesas gotas de grasa. (Glóbulos coloreables con el Sudán III.)

En cultivos viejos, diez a quince días.—Velo espeso, blanco, de aspecto céreo brillante (como estearina), la superficie del velo es rugosa, abullonada. El velo es ascendente, con frecuencia adherido fuertemente a las paredes del tubo, pero no existe anillo propiamente dicho. Grandes células esféricas o casi esféricas con gruesos glóbulos de grasa, que en algunas de aquéllas, ocupan gran parte del volumen celular. Dimensiones de las células (7-10) μ de diámetro. Figura 27 (microfotografía) y figura 28 (dibujo).

Crecimiento en mosto de uva peptonado, a 25° de temperatura. A las veinticuatro horas de la siembra se inicia el velo en islotillo de aspecto céreo, coherente; líquido transparente; no hay depósito. Células esféricas, muchas con vacuola y todas con protoplasma finamente granuloso.

A las cuarenta y ocho horas, velo de aspecto céreo, finamente rugoso, ascendente, en anillo adherente a la pared del tubo. El velo es de color blanco-sucio, con débil matiz crema tostada (en malta el velo es blanco puro y se forma y crece más rápidamente que en mosto). Líquido brillante, no hay depósito. La mayoría de las células, esféricas; con protoplasma fina y abundantemente granuloso. Muchas células en gemación; algunas conservan aún la vacuola (ver microfotografía en figu-

ra 29). Dimensiones de las células: células esféricas (4,8 — 5) + (6,9 — — 8,1) μ.

A los seis días, el aspecto del velo no ha cambiado mucho, aunque parece algo más húmedo. La mayoría de las células son esféricas, muy granulosas, sin vacuola, pero en algunas de las células en gemación se prolonga ésta en pico o tubo más o menos prolongado y deforme, dando origen a formas extrañas, monstruosas. Figura 30 (dibujo).

En cultivos muy viejos, el velo tiende a caer y llega a hacerlo en trozos, formándose depósito, pero conservándose el líquido brillante o muy poco turbio.

Crecimiento en agar de malta.—A los siete días, estría bien desarrollada, con bastantes expansiones laterales. El aspecto de la estría es muy rugoso, plegado, con una rugosidad longitudinal y otras transversales, a su vez ramificadas a modo de nervadura principal y secundarias, etc., de la hoja de una planta. El color de la estría es blanco, con ligerísimo matiz crema.

A los dieciocho días, aspecto análogo, pero la rugosidad es aún más marcada y compleja, a modo de mesenterio, pero conservando la estructura penninervia en las nervaduras principales (ver fotografía en fig. 31).

A los treinta días no ha variado mucho el aspecto arriba descrito; la estría parece algo más seca y la costilla central aún más elevada. Células esféricas con protoplasma muy granuloso; algunas células con una gruesa vacuola (ver dibujo fig. 32). No hay células deformes.

Crecimiento en gelosa de mosto peptonado (al 1 por 1.000). A los siete días estría desarrollada, blanco-crema, de aspecto ceroso, brillante; borde muy ligeramente festonado.

A los dieciocho días la estría es más elevada, algo rugosa (mucho menos que en gelosa-malta), con puntuaciones a modo de pequeños cráteres y con nervaduras transversales poco aunadas.

A los treinta días, igual aspecto (ver fotografía en fig. 33). Células esféricas, algunas muy grandes (mucho menor uniformidad que en agar-malta). El contenido de las células es muy granuloso, sin vacuolas (ver dibujo en fig. 34).

Crecimiento sobre patata.—Pátina blanco grisáceo, harinosa, pero

no seca en los primeros días. A los siete van tomando aspecto seco los bordes, y en esa fecha aún no confluyen todas las pequeñas colonias con las cuales se inició el crecimiento. El aspecto del cultivo no varía en fechas posteriores hasta los treinta días. Sólo en pátinas muy viejas, cuando la patata se ha ennegrecido y secado parcialmente, el color de la pátina vira al color crema o siena claro.

Células esféricas cuyo contenido es rico en pequeñas granulaciones, como ocurre en los cultivos sobre otros medios. Algunas células con una, y pocas veces con dos o más vacuolas, lo mismo en pátinas jóvenes (siete días) que en las viejas (treinta y más días a 25º). En cultivos jóvenes se observan algunas células de gran tamaño y contorno irregular (ver microfotografía en fig. 35). No hay esporulación, ni aún después de sesenta días. Dimensiones de las células a los siete días: células esféricas (6,5-9) µ de diámetro, media = µ. Células gigantes hasta de (11-13) µ.

Crecimiento sobre zanahoria.—A los siete días, pátina de moderado desarrollo, blanquecina (blanco-grisáceo), de aspecto mucoso, húmedo. En días sucesivos varía poco el citado aspecto. En pátina joven (siete días), células esféricas, como en todos los medios muy ricas en gránulos pequeños refringentes, muy uniformemente repartidos en el protoplasma. Son excepcionales las células vacuoladas (ver microfotografía en figura 36). Dimensiones de las células a los siete días: (5,5-8) µ de diámetro; media 7 µ.

Placa de yeso.—No hay esporulación; las células se conservan granulosas y aún acentúan con el tiempo la granulación (células envejecidas).

Picadura de gelatina.—Sólo se forma colonia superficial, blanca, cerosa, muy rugosa, a modo de circunvoluciones cerebrales; al envejecer la superficie de la colonia se hace también granulosa. La liquefacción de la gelatina es lenta y a 15º; comienza a los cuarenta-cincuenta días, más tarde progresa y a los sesenta-setenta días se observa liquefacción en cilindro.

Colonia gigante sobre gelatina-malta.—Análogo aspecto al descrito para la colonia que se forma, superficial, en la picadura (ver fotografía

en fig. 37). Más tarde, la colonia se aplana y se extiende por ablandamiento de la gelatina.

Colonia gigante sobre agar de malta.—Muy típica, blanca, con ligero matiz crema que se extiende mucho sobre el sustrato en forma de contornos amplia y profundamente lobados. La superficie de la colonia es plegada-rugosa, a modo de nervaduras. Envejeciendo la colonia estas rugosidades adquieren color crema o siena claro. En la fotografía 38 reproducimos una colonia a los sesenta días de la siembra; la fotografía está tomada por transparencia para acusar mejor la forma de las rugosidades y contorno.

Fermentación.—No fermenta ninguno de los azúcares ensayados.

Asimilación de azúcares:
Arabinosa y xilosa +
Glucosa, manosa, galatosa, levulosa +
Sacarosa, maltosa, lactosa +
Manitol +
Dextrina +
La maltosa parece que proporciona el máximo desarrollo.

Asimilación del alcohol.—En el medio de Stelling-Dekker (4), positiva, aunque el crecimiento es lento.

Asimilación de substancias nitrogenadas:
Nitrato potásico +
Sulfato amónico + (desarrollo más escaso que en nitratos).
Urea +
Peptona +
El crecimiento sobre agar sintético con nitratos (5) es bastante abundante, en colonia o estría blanco-crema, cérea brillante. Las células en gemación presentan un aspecto muy especial en este medio; en la gemación, con frecuencia múltiple, no se completa la separación de las células hijas, lo que da a las agrupaciones formas monstruosas (ver fig. 39).

Sistemática.—Siguiendo la clave que para el género Torulopsis (al que evidentemente pertenece la levadura núm. 42-C de nuestro catálogo provisional) incluye Lodder en su obra, llegamos a la especie aeria (Saito) nov. com., pero al comparar más detalladamente los caracteres de

esta especie con los de la estirpe núm. 42-C encontramos notables discrepancias, que podemos resumir como sigue:

Torulopsis aerea (Saito) Lodder.	Torulopsis 42-C.
A las veinticuatro horas, a 25°, en malta, células de (3,5-5) × × (4,2-6) µ.	A las cuarenta y ocho horas, a 25°, en malta, células de (5-7) × (5-12) µ.
En malta, anillo y depósito. No hay velo.	En malta, velo, sin depósito, desde las primeras horas. Sólo en cultivos viejos hay depósito.
Estría en agar-malta ligeramente amarillenta, mate-brillante, lisa, bordes lisos.	Estría en agar-malta, muy rugosa, plegada a modo de nervaduras; bordes lobados color blanco con débil matiz crema.
Liquefacción de la gelatina: a los sesenta días, a 15°, negativa (en la descripción de Saito, lenta liquefacción de la gelatina).	Liquefacción de la gelatina: a los cuarenta-cincuenta días, a 15°, comienzo; a los sesenta días, liquefacción franca, en el cilindro.
Asimilación de la lactosa (?).	

Más acusadas resultan aún las diferencias de la Torulopsis 42-C con la T. albida (Saite) nov. comb. y la T. albida, var. Japónica nov. var., que son, entre las descritas por Lodder, las únicas que podrían ser identificadas con la 42-C, si la estría sobre agar-malta fuera mucilaginosa, lo que no ocurre. Es difícil la identificación de la Torulopsis, que describimos con las estudiadas por Will y las descritas por Guillermond, dada la deficiencia de las descripciones, y por ello nos parece (para no contribuir a aumentar la confusión reinante en la sistemática de las levaduras anascoporógenas, con la creación de nuevas especies que pudieran ser idénticas a algunas insuficientemente descritas) que es preferible limitar la diferenciación de estirpes, que no sean radicalmente distintas de otras, al concepto de variedad, aunque de este modo se llegue, prácticamente, a formar especies colectivas, con carácter provisional, integradas por cepas que difieren entre sí más que otras que han sido consideradas como especies nuevas.

Con esta idea clasificamos a la estirpe núm. 42-C de nuestro Catálogo como Torulopsis aerea (saito), variedad granulosa (Marcilla-Feduchy) nov. var., aludiendo en el último nombre al típico aspecto de las células, desde su primera edad, en cultivos sobre diversos medios.

Hasta aquí se ha expuesto literalmente la redacción que se hizo con don Juan Marcilla, cuando, según la clave de Lodder (7), fué clasificada esta levadura.

La descripción de la Torulopsis aerea en la moderna clave de Lodder-Kreger-Van Rif (8) no presenta características diferentes de las anteriormente expuestas; solamente en los cultivos en estría sobre agar de malta alude, refiriéndose a las de un mes, a 17°, a ligero rayado en la superficie y a bordes ligeramente ramosos, por lo que las diferencias expuestas con la Torulopsis aerea, variedad granulosa, descrita siguen existiendo.

En la obra Lodder-Kreger-Van Rif (8) ha tenido la atención de citar esta levadura, de la que aún no tenía características.

CANDIDA PULCHERRIMA, VARIEDAD LIQUEFACIENS

Procede de pulpa de naranja, de donde fué aislada por el Ingeniero don Juan Santa María, con el fin de ensayarla en la multiplicación de levadura para alimento.

En los trabajos, también sobre el tema de multiplicación de lavadura para pienso, que seguimos con el Prof. don Juan Marcilla (1), fué esta levadura una de las más empleadas. La levadura en estudio se consideró en un principio como Torulopsis pulchérrima, variedad liquefaciens, por su intenso poder proteolítico; fué clasificada después como Cándida pulchérrima, variedad liquefaciens (Marcilla). Por sus características y por haber figurado en los aludidos trabajos sobre multiplicación, es una de las levaduras elegidas para esta publicación.

Segunda selección.—Del cultivo puro se hizo una nueva siembra de aislamiento en gelatina de malta, de la que nacieron colonias blancas y rosado-rojizas. Las colonias blancas estaban más desarrolladas y comenzaban a liquidar la gelatina, por lo que se consideraron como de mayor interés y se sembraron en agua de malta.

Por ser el fin perseguido, el partir de un cultivo puro para ser ensayo en las experiencias de multiplicación de levaduras, se realizó nuevo aislamiento en agar malta de las colonias blancas desarrolladas en malta. En esta tercera selección nacieron sólo colonias blancas, con aspecto jugoso y brillante. Al microscopio presentan células elípticas y otras alargadas, con vacuola bien definida en las dos formas, gemación subpolar.

Cultivo en malta.—La siembra procedente de colonia blanca antes descrita presenta a las cuarenta y ocho horas masa pulverulenta en suspensión cerca de la superficie del líquido, iniciando tenue velo y en el fondo pequeño depósito. Al microscopio, células ovales, ovales-alargadas y ovales redondeadas. Gemación en la que se aprecia frecuentemente que la célula hija presenta forma mucho más alargada que la célula madre, lo que comprobó que las dos formas diferentes pertenecen a la misma levadura.

Tamaños: (3,1-5,9) × (6,1-10,3) μ. Fig. 40.

Cultivo en malta a las setenta y ocho horas. Velo no completo formado por grumos flotantes sueltos, grumos que son difíciles de dislacerar entre porta y cubre.

Al microscopio presentan células elípticas vacuoladas y alguna con gemación (que es subpolar), corpúsculo refrigerante y en algunas de mayor tamaño, más grueso corpúsculo que, como el anterior, es de naturaleza grasa.

En la figura 41 se aprecia una partícula dislacerada de un grumo.

En la figura 42 se aprecia el aspecto de las células de una preparación procedente de cultivo en malta a las setenta y ocho horas.

Cultivos viejos.—Cultivo de un mes en malta presenta células con grueso corpúsculo grano en el interior, que casi le ocupa por completo. En la fig. 43 se ve ampliado el detalle de célula rota por presión de cubre, saliendo al exterior el corpúsculo graso.

Fermentaciones de azúcares:	Glucosa	+	maltosa —
	Galactosa	—	lactosa —
	Sacarosa	—	
Asimilación de azúcares:	Glucosa	+	
	Galactosa	(+)	débilmente
	Sacarosa	+	

Maltosa —
Lactosa — muy débil

Asimilación de nitratos: = (+) débil
Asimilación de alcohol ..... = + depósito y velo
Cultivo en leche tornasolada.. No la coagula
Hidrólisis arbutina ..... = —

Cultivo en mosto.—Se empleó mosto de 10° Baumé peptonado, con 1 gr. por 1.000 de peptona Wite. A las cuarenta y ocho horas de sembrado presenta el mosto franca fermentación, de la que a las setenta y dos horas sólo se aprecian ligeras burbujas que se desprenden del fondo.

El líquido está turbio, masa pulverulenta en la superficie, anillo también pulverulento adherido a la pared y depósito en el fondo.

Al microscopio.—Células elípticas, ovales y alargadas. Gemación polar y subpolar, contenido celular liso con vacuolas aún no bien marcadas en varias células y en otras bien definidas, simples o dobles y con o sin corpúsculos refrigerantes (fig. 44).

A las setenta y dos horas, como ya se ha indicado, sólo acusa restos de fermentación, desprendiéndose alguna burbuja del fondo. Grumos flotantes y trazas de anillo.

Al microscopio se observan células ovales, ovales alargadas, con corpúsculos grasos aún no gruesos y en número de uno a dos (fig. 45)

En cultivo de siete días se aprecia velo incompleto formado por partículas flotantes, acusando alguna coloración rosa franco; también se conserva anillo incompleto.

Al microscopio se aprecian células ovales, algunas alargadas y con corpúsculo graso en número de uno a dos y en este caso en polos opuestos.

Para comprobar la permanencia del color rosado, se hizo nuevo aislamiento en agar de malta sembrado de velo rosa, y las colonias que nacieron fueron blancas, permaneciendo así durante cinco días que se observaron.

Las células del velo rosado presentan al microscopio formas ovales alargadas con uno o dos corpúsculos refringentes (fig. 46).

Cultivos viejos.—Cultivo en mosto de cincuenta días; presenta velo denso muy rugoso, ascendente, color blanco grisáceo. Al microscopio presenta células con grueso corpúsculo graso y algunas con dos cor-

púsculos y envueltas por membrana que tiende a desaparecer, presentando las células aspectos extraños (fig. 46).

Agar malta.—Estría de cuarenta y ocho horas a 25º. Presenta aspecto jugoso y granuloso por estar formado por un conjunto de pequeñas colonias aglutinadas, que en la base de la estría forman una masa de aspecto liso y brillante, color marfil.

Al microscopio, células elípticas, algo ovales, con vacuola que en algunas ocupa la casi totalidad de la célula (fig. 47).

Estría de cuarenta días. Presenta aspecto blanco liso, con bordes finamente filamentosos, lo que se aprecia claramente en la figura 48 a.

En la figura 48 b se ven células procedentes de colonia en agar malta a los cien días. Tienen el aspecto característico de las formas típicas de p u l c h é r r i m a .

En la figura 49, colonia gigante sobre agar malta.

En agar mosto.—A las cuarenta y ocho horas de sembrado en estría se aprecian al microscopio células elípticas, algunas alargadas y con pequeño corpúsculo refringente.

En un cultivo de cien días se observan varias formas con apéndice de forma mazuda (fig. 50).

Poder proteolítico.—Es característico de esta levadura el intenso poder proteolítico, liquidando intensamente la gelatina, lo que se aprecia en la figura 51, en la que se ve sumergirse el cultivo al ir liquidando la gelatina.

Pigmentación rosada.—Comprobada la aparición del color en las partículas que a los siete días forman velo incompleto en mosto, lo que está de acuerdo con las observadas por Berta Porchet en su estudio sobre T o r u l o p s i s - p u l c h é r r i m a , que forma velos rosa-rojizos sobre mosto, los que alternan con blancos y que caen al fondo formando grumos.

Se hizo nuevo aislamiento en agar malta y después se hizo la siembra en forma de colonia gigante sobre agar malta con sal ferrosa, desarrollándose colonia intensamente rosa, ya más bien grana, presentando franjas blancas (fig. 52).

En otra colonia gigante sobre el mismo medio de agar malta con sal

ferrosa aparecen también franjas rosadas y blancas, observándose también una progresiva difusión de la coloración rosa en el agar, formando círculo concéntrico (fig. 53).

De la colonia grana se hacen preparaciones para observar al microscopio, apreciándose células elípticas, elíptico alargadas, con coloración rosada y vacuoladas (fig. 54). Después de quince días, nueva preparación de la colonia, que ya perdió color y presenta tono rosado pálido; la preparación acusa al microscopio células elípticas y elíptico-redondeadas, de tono más pálido y con corpúsculo graso, ya bastante grueso en las células de mayor tamaño (fig. 55).

De la colonia grana se sembró en mosto de uva peptonado, se formó masa de partículas flotantes y anillo, ambos de color blanco, que más tarde toman una coloración crema-rosado. De este cultivo, aún blanco, se sembró sobre agar malta con sal ferrosa, naciendo colonia blanca que a los siete días tomó tono rosado.

Se hizo otra siembra para colonia gigante sobre agar malta con sal ferrosa; tomando de cultivo en fase rosada, nació colonia que a los cuatro días tomó coloración grana con franjas blancas. De estas siembras parece deducirse que de velo blanco en mosto, procedente de colonia rosada, nacen sobre agar malta con sal ferrosa colonias r o s a d a s, y si la siembra sobre este agar procede del velo en fase rosada, nacen colonias g r a n a s.

Se hicieron observaciones de cultivos viejos en agar de levadura con azúcares (de los empleados para ensayos de fermentación) y se apreció aparición de coloración rosa en el líquido, en el velo de partículas y en los depósitos de varios de ellos, con el detalle de que en el depósito había capas de tonos blancos y rosados.

En las anteriores observaciones se encuentra un acuerdo con varias de las expuestas en los trabajos de Berta Porchet (9), Castelli (10), Santa María (11) y van Der Walt (12), que dedica al estudio del pigmento de la C á n d i d a p u l c h é r r i m a en tesis doctoral, y en él comenta muy acertadamente trabajos anteriores y propios, aludiendo a los de Windisch (13), Grobusch, Roberts, Beigerinck (14), Wiekerham, referentes a las influencias en la producción de pigmento, de la presencia de hidratos de carbono, sal ferrosa. Realizó cultivos en medios sintéticos adicionados de hidratos de carbono, acusando aparición de pigmento, debido a posible presencia de trazos de hierro por impureza de

los hidratos de carbono. La influencia de la presencia de hierro para la aparición de pigmentos queda también aclarada por las experiencias de van Der Walt (12), referentes a la influencia de la dosis de hierro, la que en pequeña cantidad no da origen a coloración y en dosis demasiado elevada tampoco, lo que explica el desacuerdo de los investigadores sobre este asunto.

Respecto a la aparición de pigmento en medios a los que no se adicionó traza de hierro, puede explicarse por existir, ya naturalmente ó accidentalmente en el medio, como ocurre en los medios a base de patata, de mosto de uva con azúcares no completamente puros.

El poder cromógeno por el que la célula se pigmenta a base de hierro es, según Beijerinck (14), debido a la formación de una substancia cromógena incolora, la que, reaccionando con el hierro, da lugar a la formación del pigmento. Alude también a la inconstancia de la aparición del pigmento, exponiendo diferentes hipótesis que parecen acertadas, pero que demuestran la inseguridad del dato de la aparición de dicho pigmento para la clasificación.

Formación de seudomicelio.—Con el fin de observar la formación del seudomicelio se hicieron siembras sobre agar de patata directamente, en estría o sobre papel celofán extendido sobre el agar. No se apreció formación de seudomicelio. A los ocho días solamente presentaba estría blanca con pequeños trozos rosados, formada por células que no se agrupaban en seudomicelio. Estas células presentaban formas redondeadas, grandes, con corpúsculo graso que ocupaba casi la totalidad de la célula, aspecto típico de P u l c h é r r i m a ; también había formas alargadas y pequeñas, con corpúsculo refringente de pequeño diámetro.

En preparaciones de velo de mosto, se acusaron cadenas de tres-cuatro células y con otras células laterales que recordaba el seudomicelio. La dificultad de la preparación sin desbaratarlo pudo ser causa de no verlos más completos.

De un cultivo en mosto procedente de colonia carmín, y a los veinte días de nacido, se hizo una preparación de partícula flotante: las que presentaban coloración crema pardo y ya comienzan a caer a fondo. Al microscopio pudo apreciarse seudomicelios cortos con sencilla pero franca ramificación (fig. 56), y células redondas típicas de p u l c h é r r i m a y otras formas diferentes.

Llegando a esta fase los trabajos expuestos, Santa María escogió también esta levadura junto con otros microorganismos, con el fin de emplear los medios sintéticos de Wickerham en los estudios sobre nutrición de los microorganismos (15). Con este motivo realizó una serie de interesantes observaciones referentes a la aparición o no del pigmento y del seudomicelio que fueron publicadas, por lo que consideramos ya suficientemente tratado este tema y desistimos de nueva publicación.

En la revisión expuesta de levaduras utilizadas en experiencias de multiplicación de levaduras antes aludidas, fué ésta una de las más empleadas, y por aportar los datos de su estudio, nuevamente han sido ordenados exponiéndolos en esta publicación.

Los interesantes y bien realizados estudios de Santa María confirman la idea que teníamos referente a aparición o no de diferentes propiedades como la formación de pigmento y la de seudomicelio, variaciones que, como Berta Porchet, considera Santa María debidas a la aparición de nuevas variantes, pero que creemos más o menos permanentes y dispuestas a evolucionar nuevamente según las condiciones del medio, tanto en las referentes al cultivo como a las del ambiente.

Fijando la atención en la formación del seudomicelio, éste se ha encontrado en la preparación tomada de un velo del mosto, después de no conseguir observarle en una serie de preparaciones de medios aconsejados para su formación.

También aparecen en las observaciones de Santa María en un lóbulo de una colonia gigante, sin haber podido observarle antes.

Creemos más o menos permanentes y dispuestas a evolucionar según las condiciones del medio, tanto en las referentes al cultivo como a las del ambiente.

Por los datos expuestos seguimos considerando a la levadura en estudio, y de acuerdo como se la denominó en las publicaciones de los trabajos donde fué empleada: C á n d i d a p u l c h é r r i m a, variedad L i q u e f a c i e n s (Marcilla †), por su marcado poder proteolítico que liquida fuertemente la gelatina.

RESUMEN

Se continúa una exposición de características y clasificación de levaduras de la «flora» española, eligiendo para esta publicación varias de

las que fueron objeto de alguna experiencia o ensayo en los trabajos que sobre diferentes temas relacionados con levaduras fueron realizados con el Profesor don Juan Marcilla (†).

Se ha destacado una del género C á n d i d a que se consideró interesante en los estudios de multiplicación de levaduras para desarrollo en superficie. Otra C á n d i d a, variedad de la P u l c h é r r i m a, que fué empleada en varias experiencias de multiplicación, y una T ó r u l a salvaje de intensa e interesante granulación.

En estos trabajos, que fueron comenzados con el Prof. Marcilla, ha colaborado en su continuación su hija, la señorita Pilar, Auxiliar de la Investigación del C. S. I. C.

BIBLIOGRAFIA

(1) **MARCILLA, J.**, y **FEDUCHY, E.**—1945. Materias primas españolas para la fabricación de «levaduras pienso». **Boletín del Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas.** XII: 153-226. Madrid.

(2) **MARCILLA, J.; FEDUCHY, E.; HIDALGO, L.**, y **GARRIDO, J.**—1950. Estudio de la utilización de los prehidrolizados de carazos de maíz (mazorcas desgranadas) en la fabricación de levaduras alimenticias. **Cuaderno I del Instituto de Microbiología General y Aplicada.**

(3) **MARCILLA, FEDUCHY** y **REUS.** 1947.—La fabricación de levaduras-pienso a partir de los rizomas tuberosos de los gramones (A s p h o d e l u s) en España. **Boletín del Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas.** XVI: 1-91.

(4) **HIDALGO, L.**, y **GARRIDO, J.**—1951. Aprovechamiento industrial de los residuos agrícolas, 2.ª parte. Sección Fermentaciones Industriales. Patronato «Juan de la Cierva» (C. S. I. C.).

(5) **CASTELLI.**—1939. I lieviti della fermentatione vinaria del Chianti classico e zona limitrofe. **Nuovi Annali dell'Agricoltura.** 19.

(5) ——— 1947. I lieviti del Piceno. **Ann. Facolta di Agraria** (Pérouse), n.º 4.

(5) ——— 1947. Y lieviti dei mosti delle Sicilia. **Italia Agrícola,** n.º 9.

(6) **MARCILLA, ALAS, FEDUCHY.**—Contribución al estudio de levaduras que forman velo sobre ciertos vinos de elevado grado alcohólico.

(6) **MARCILLA, J.; FEDUCHY, E.**, y **MARQUES, J.**—1945. Contribución al estudio de levaduras salvajes y cultivadas de la microflora española y

portuguesa. **Trabajos del Instituto Cajal de Investigaciones Biológicas.** II: 161. C. S. I. C.

(7) **LODDER, J.**—1942. Die anaskosporogenen Hefen.

(8) **LODDER, J.,** and **KREGER van RIF.**—1952. The Yeasts.

(9) **PORCHET, B.**—1936. Contribution a l'etude de la levure Torulopsis Pulcherrima. **Annales des Fermentations.** IV. n.º 7, 1.938.

(10) **CASTELLI, T.**—1940. Considerazioni sulla Torulopsis Pulcherrima. **Arch. Mikrob.** 11: 126.

(11) **SANTA MARIA.**—1953. Empleo de los medios sintéticos de Wickerham en los estudios sobre nutrición de los microorganismos. **Microbiología Española.** Vol. 6, núm. 1.

(12) **VAN DER WALT, J. P.**—1952. On the Yeast Candida Pulcherrima and its pigment. Tesis doctoral.

(13) **WINDISCH, S.**—1940. Ent wicklungsgeschicht liche Untersuchungen an Torulopsis Pulcherrima (Linder) Saccardo und Candida tropicalis (Castellani) Berkhout. Ein Beitragzur Systematik der Gaerungsmonilien. **Arch. Mikrobi.** 11: 368.

(14) **BEIJERINCK.**—1918. Arch néeland, physcol, 2-609.

(15) **WICKERHAM, L. J.; BURTON, K. A.**—1948. Carbon asimilation tests for the classification of yeasts. **J. Bact.** 56: 363.

(16) **SOCIAS, A.**—1949. **Anales de Edafología y Fisiología Vegetal.** Tomo VIII, n.º 2: 243-262.

(17) **SCHANDERL.**—1951. **Microskopie.** Band 6 (Heft. 516).

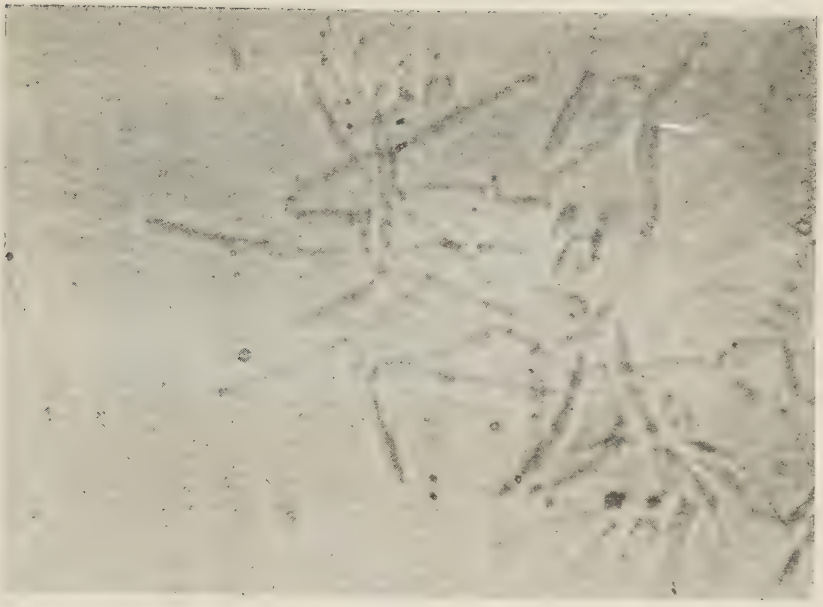


Fig. 1 a.—Candida Humicolar *var.* Asphodelo: *Células de cultivo de veinticuatro horas en malta.*

Fig. 1 b.—Cand. Hum. *var.* Asphod.—*Células de cultivo en malta de veinticuatro horas.*

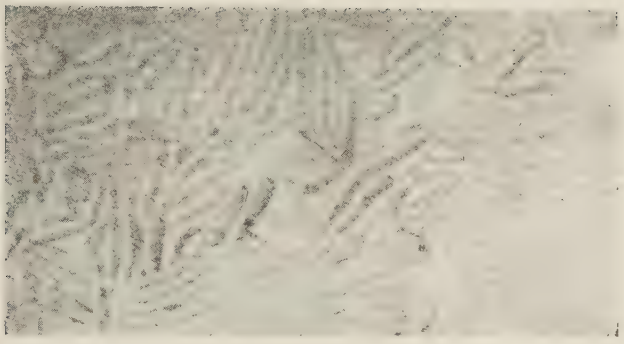


Fig. 2.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo.—*Células de cultivo en malta de cuarenta y ocho horas.*

Fig. 3.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo.—*Células de cultivo en malta de cuarenta días.*

Fig. 4 a.— Candida Humicola, *variedad* Asphodelo, *preparación de cultivo en mosto de veinticuatro horas. Aspecto de seudomicelio.*

Fig. 4 b.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo, *preparación de cultivo en mosto de veinticuatro horas. Aspecto de seudomicelio.*

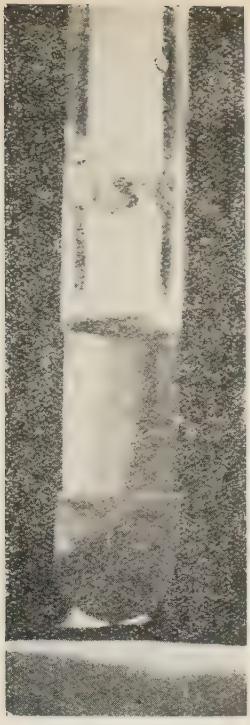


Fig. 5 a.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo, *preparación de mosto a los sesenta días.*

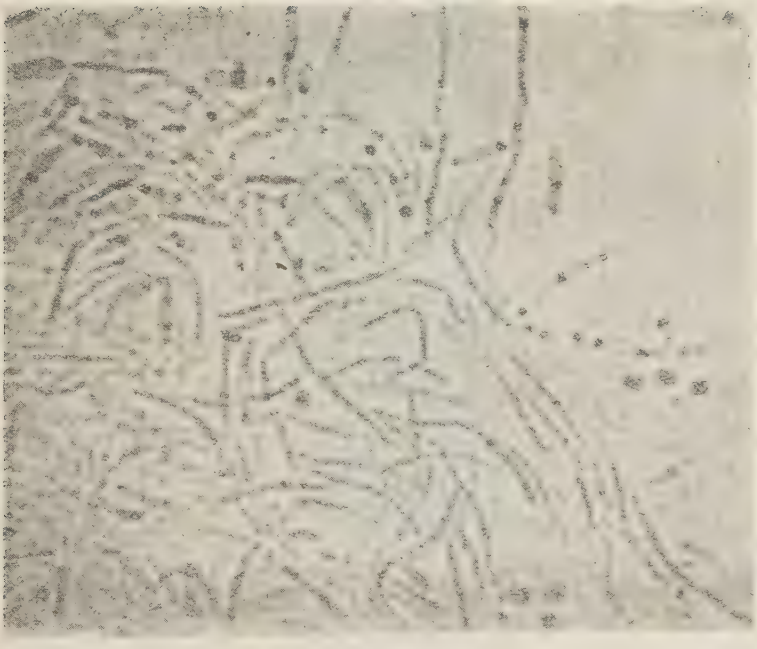


Fig. 5 b.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo, *preparación de cultivo en mosto de setenta días.*

Fig. 6.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo, *preparación de estría en gelatina de malta de cuatro días.*

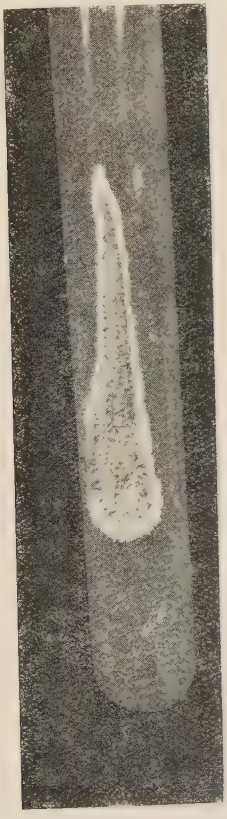


Fig. 7.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo, *estría en agar malta a los quince días.*

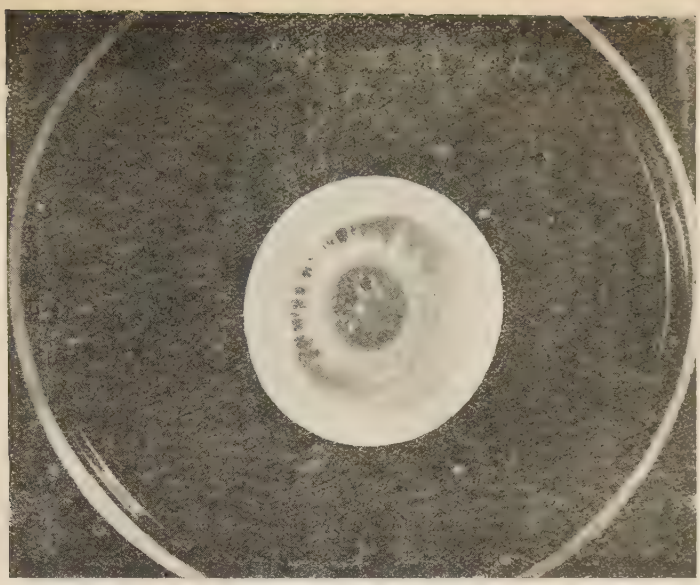


Fig. 8.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo. *Colonia gigante sobre agar malta, a los veinte días.*

Fig. 9.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo, *estría sobre agar mosto a los tres días.*

Fig. 10.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo. *Estría sobre agar mosto a las veinticuatro horas.*

Fig. 11.—Frotis sobre porta con agar mosto.

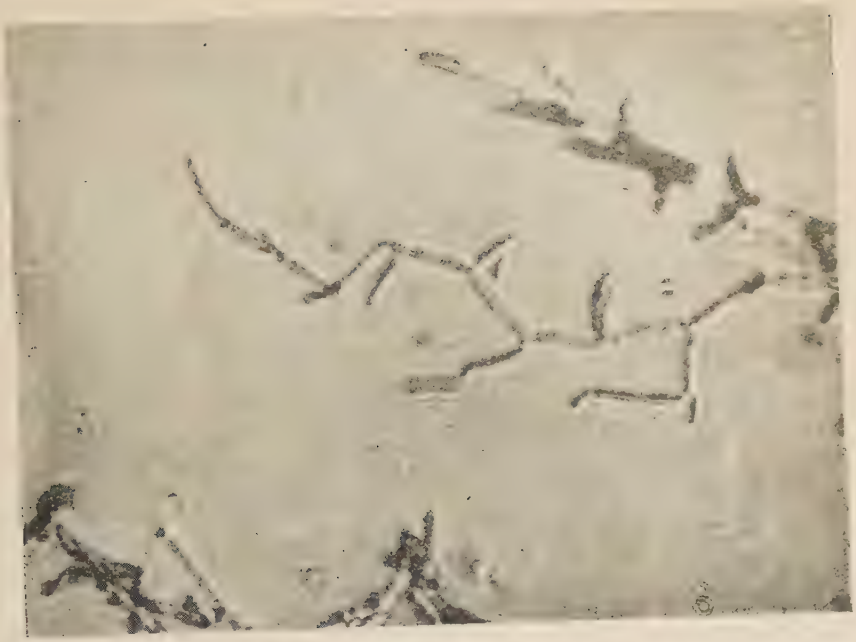


Fig. 12. Detalle de cultivo sobre frotis con agar mosto sobre porta.

Fig. 13.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo. *Cultivo sobre frotis de agar mosto sobre porta.*

Fig. 14 a.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo. *Dibujo a la cámara clara de cultivo sobre frotis de agar mosto sobre porta a las cuarenta y ocho horas*

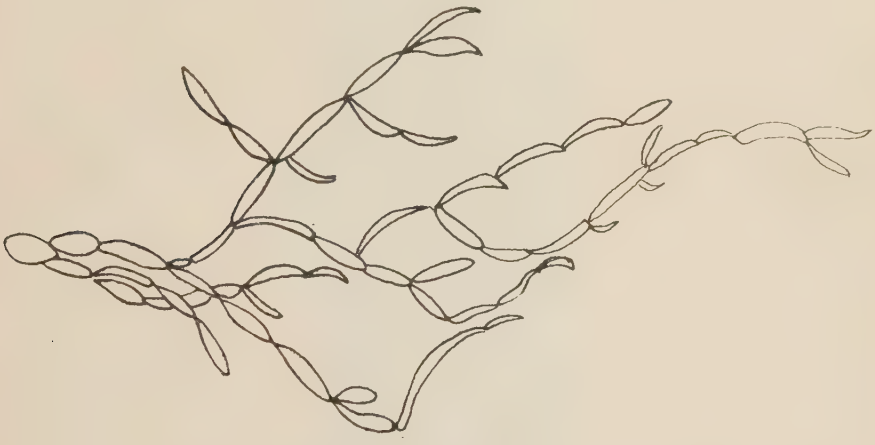


Fig. 14 b.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo, *micelio de cultivo sobre agar patata.*

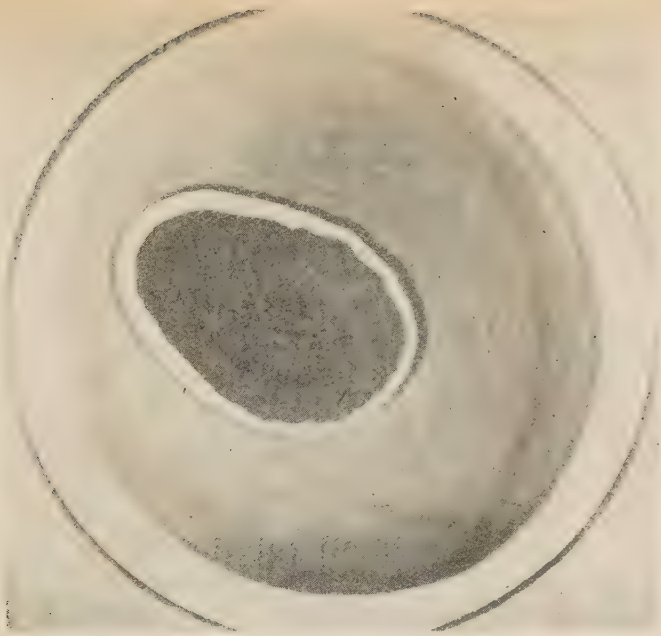


Fig. 15.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo. *Colonia gigante sobre agar mosto a los veinte días.*

Fig. 16.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo. *Estría sobre gelatina de mosto a los diez días.*

Fig. 17.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo. *Cultivo sobre patata a los dos días.*

Fig. 18.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo. *Célula de cultivo sobre patata de tres días.*

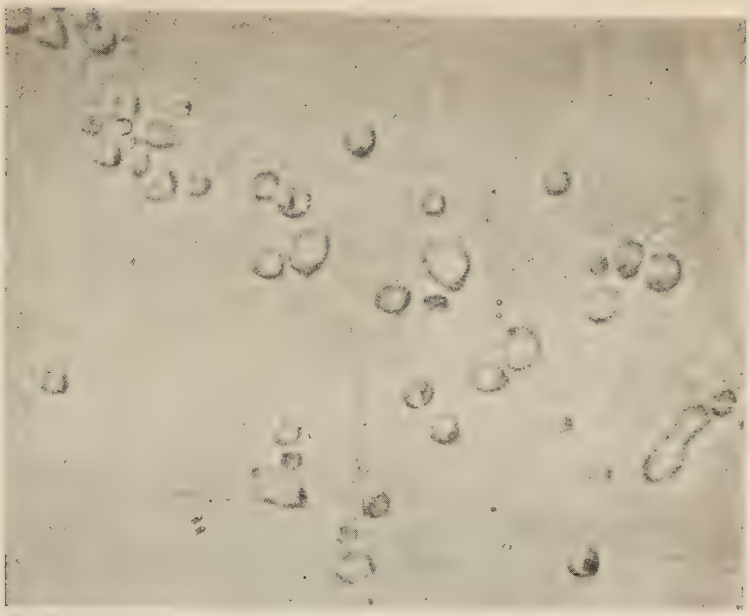


Fig. 19.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo. *Células de cultivo sobre patata de diez días.*

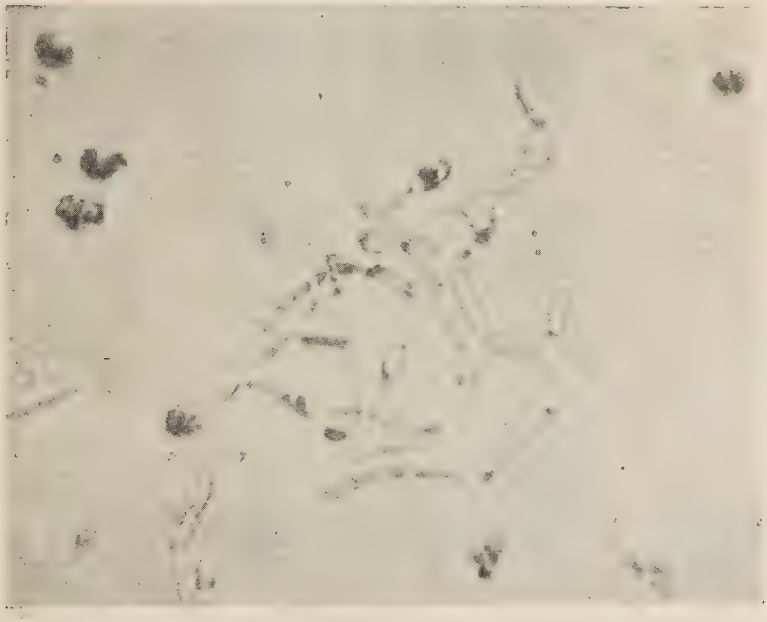


Fig. 20.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo. *Células de cultivo sobre patata de sesenta días.*

Fig. 21.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo. *Células de cultivo sobre patata a los sesenta días.*

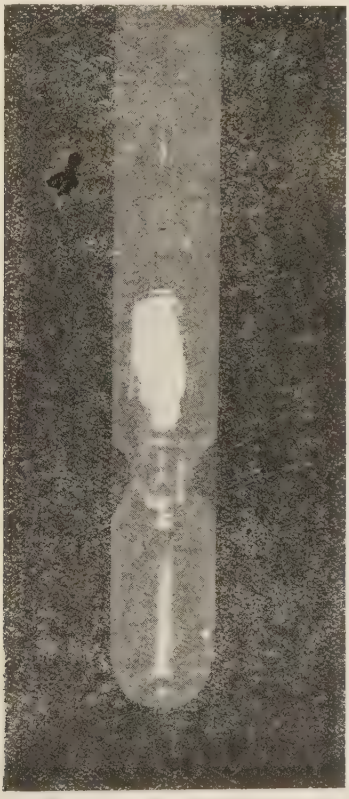


Fig. 22.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo. *Estría sobre zanahoria a los tres días.*

Fig. 23.—Candida Humicola, *variedad* Asphodelo. *Células del cultivo para estudio de asimilación de alcohol.*

Fig. 24.—Torulopsis aerea, *variedad* granulosa. *Células de cultivo en malta de veinticuatro horas.*

Fig. 25.—Torulopsis aerea, *variedad* granulosa. *Células de cultivo en malta de veinticuatro horas.*

Fig. 26.—Torulopsis aerea, *variedad* granulosa. *Células de cultivo sobre malta a los cuatro días.*

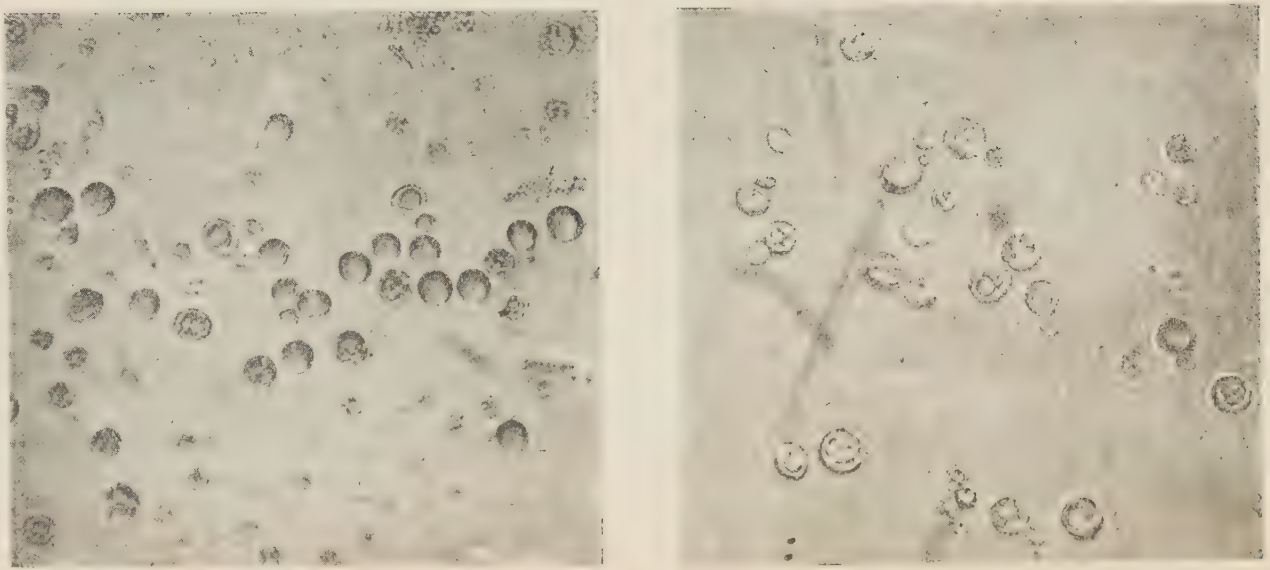


Fig. 27.—Torulopsis aerea, *variedad* granulosa. *Cultivo en malta de veinte días.*

Fig. 28.—Torulopsis aerea, *variedad* granulosa. *Células de cultivo en malta a los veinte días.*

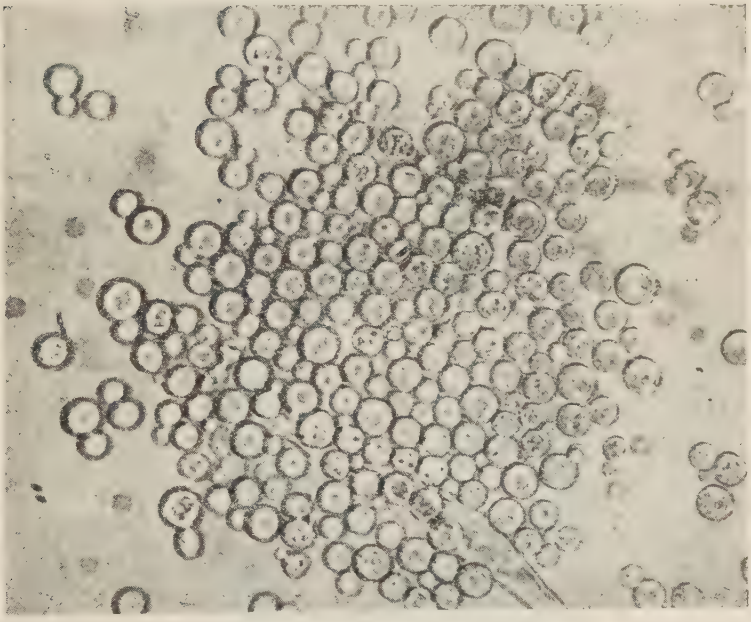


Fig. 29.—Torulopsis aerea, *variedad* granulosa. *Cultivo en mosto a las veinticuatro horas.*

Fig. 30.—Torulopsis aerea, *variedad* granulosa. *Cultivo en mosto de seis días*

Fig. 31.—Torulopsis aerea, *variedad* granulosa. *Estría sobre agar de malta a los dieciocho días.*

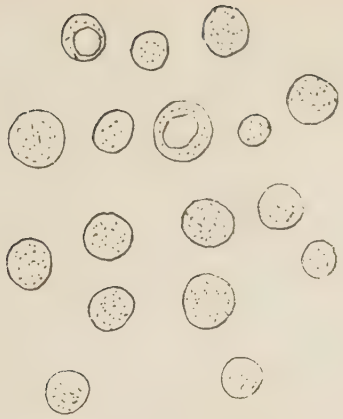


Fig. 32.—Torulopsis aerea, *variedad* granulosa. *Células de cultivo sobre agar malta de treinta días.*

Fig. 33.—Torulopsis aerea, *variedad* granulosa. *Estría sobre agar de mosto a los treinta días.*

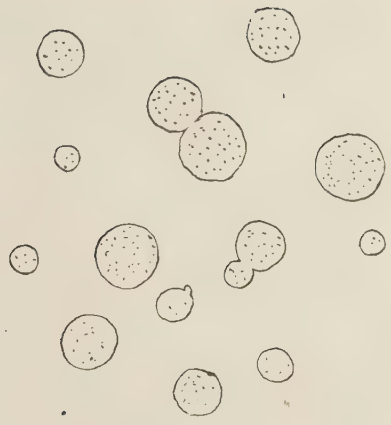


Fig. 34.—Torulopsis aerea, *variedad* granulosa. *Células de cultivo de treinta días sobre gelosa de mosto.*

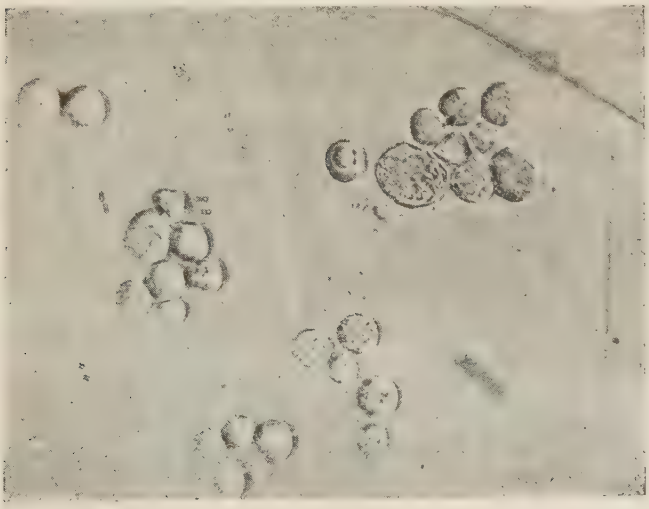


Fig. 35.—Torulopsis aerea, *variedad* granulosa. *Células de cultivo sobre patata de siete días.*

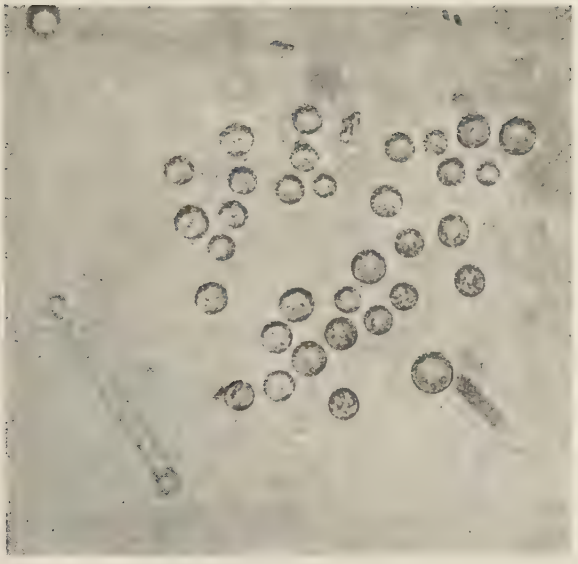


Fig. 36.—Torulopsis aerea, *variedad* granulosa. *Células de cultivo sobre zanahoria a los siete días.*

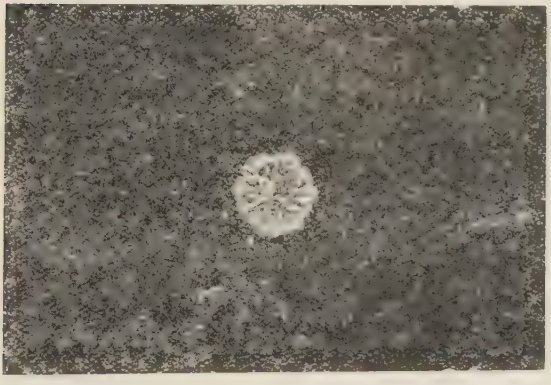


Fig. 37.—Colonia gigante sobre gelatina de malta a los catorce días.

Fig. 38.—Colonia gigante sobre agar malta a los sesenta días.

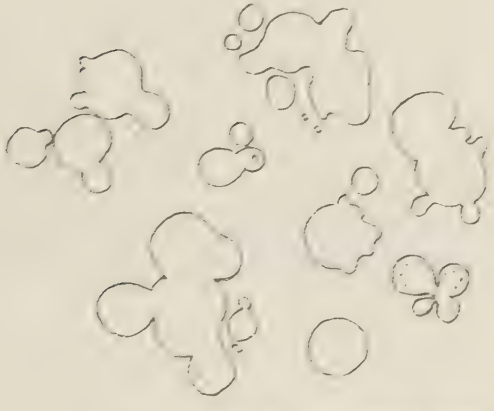


Fig. 39.—Aspecto de células de cultivo en ensayo de asimilación de nitratos.

Fig. 40.—Candida Pulcherrima, *var.* liquefaciens. *Células de cultivo en malta a las cuarenta y ocho horas.*

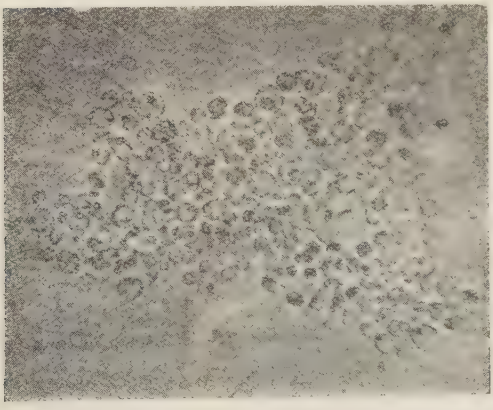


Fig. 41.—Cand. Pulch., *var.* liquefaciens. *Cultivo en malta a la setenta y dos horas, grumo del velo.*

Fig. 42.—Can. Pulch., *var.* liquefaciens. *Células de cultivo en malta a las setenta y ocho horas.*

a b

Fig. 43.—Cand. Pulcherrima. *var.* liquefaciens. *a) Cultivo en malta de cuarenta días. b) Células de cien días, rotas por presión del cubre.*

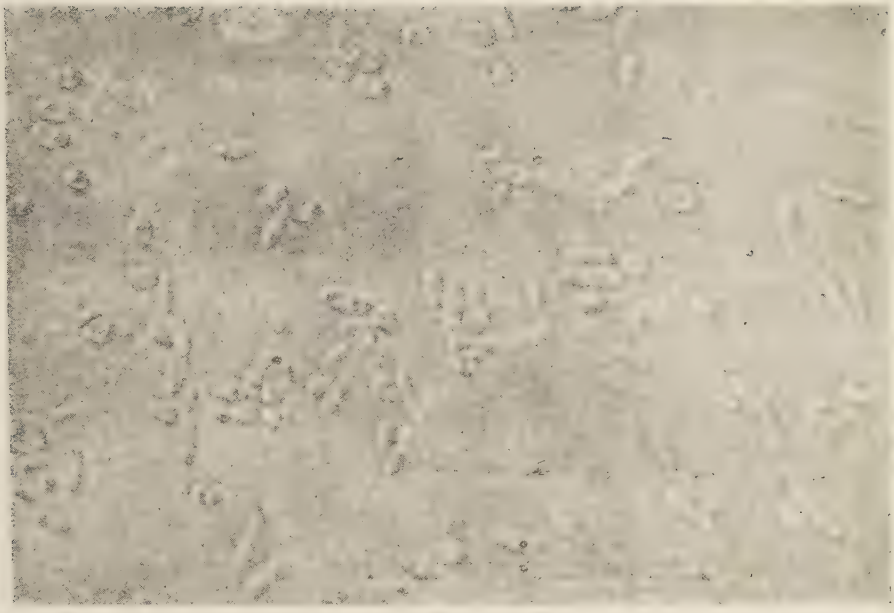


Fig. 44.—Cand. Pulch., *var.* liquefaciens. *Células de cultivo en mosto a las cuarenta y ocho horas.*

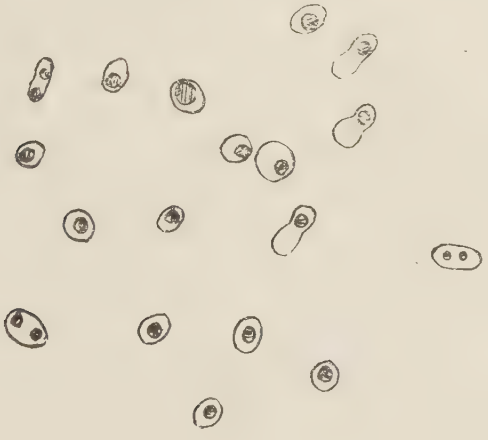


Fig. 45.—Cand. Pulch., *var.* liquefaciens. *Células de cultivo en mosto a las setenta y dos horas.*

Fig. 46 a.—Cand. Pulch., *var.* liquefaciens. *Células de velo en mosto, de tono rosado, de siete días.*

Fig. 46 b.—Candida Pulcherrima, *var.* liquefaciens. *Células de cultivo en mosto a los cincuenta días, tomadas de velo.*

Fig. 47.—Células de cultivo en agar malta, a las cuarenta y ocho horas.

Fig. 48 a.—Cultivo sobre agar malta, de treinta días.

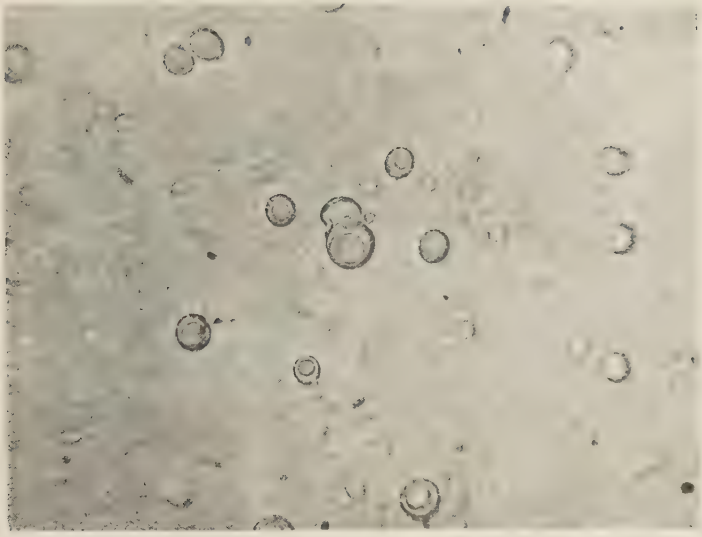


Fig. 48 b.—Colonias sobre agar malta, a los cien días. Se aprecia el corpúsculo y el trozo de membrana adherida, típico de pulcherrima.

Fig. 49.—Colonia gigante sobre agar malta.

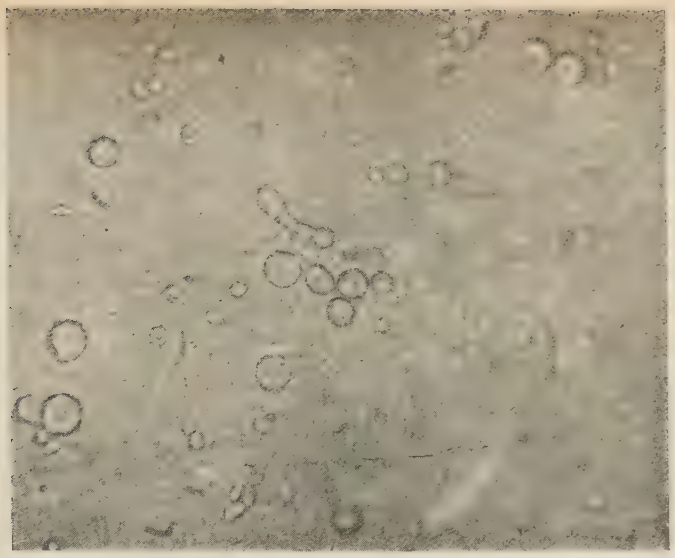
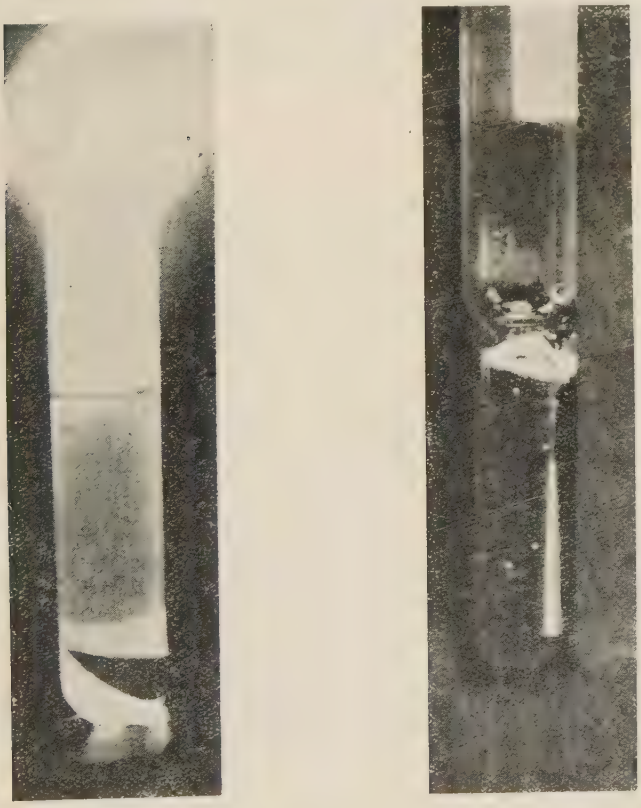


Fig. 50.—Agar mosto, cultivo de cien días.



a b

Fig. 51.—a) Gelatina de malta, y b) gelatina de mosto, liquidadas por cultivo Candida Pulch., *var.* liquefaciens.

Fig. 52.—Colonia en agar de malta con sal ferrosa. Se aprecian las zonas coloreadas de rosado.

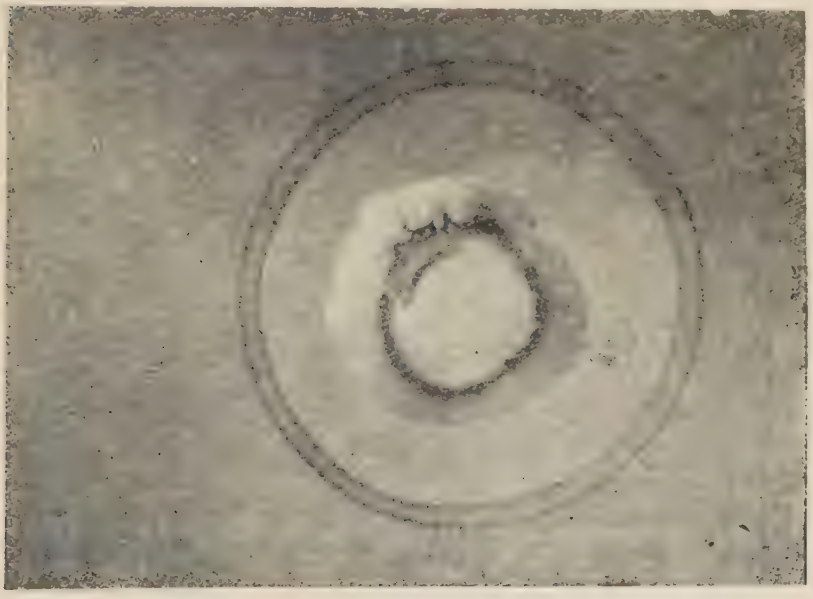


Fig. 53.—Colonia gigante sobre agar malta, apreciándose en ella la difusión de la materia colorante.

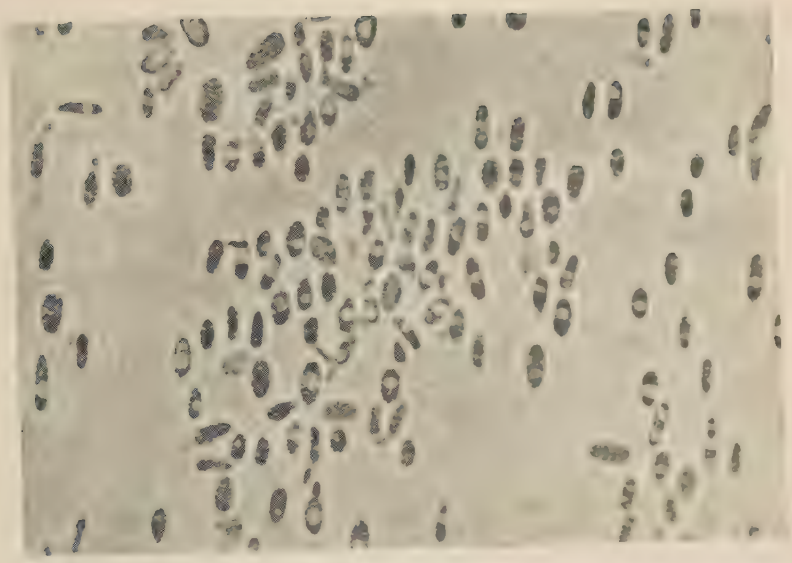


Fig. 54.—Células procedentes de la parte coloreada de grana en la colonia gigante en agar malta.

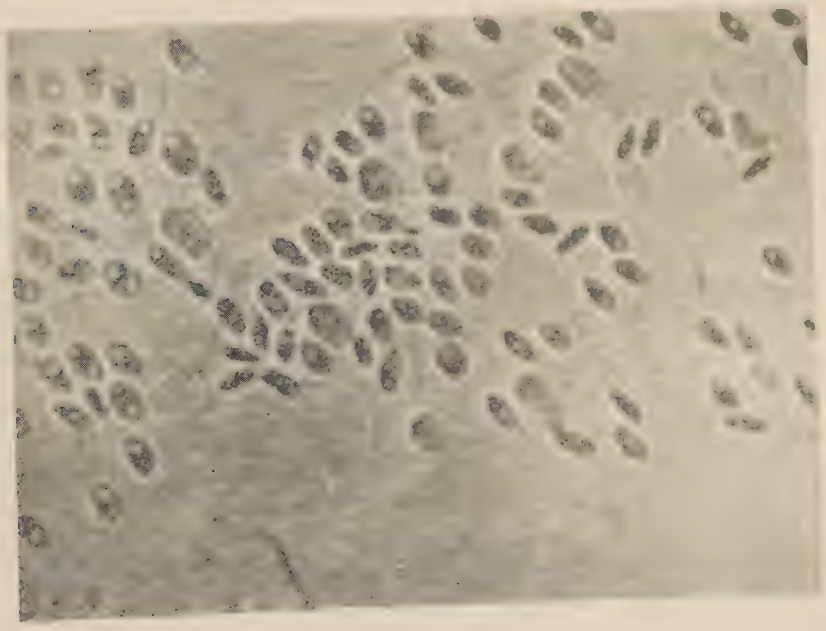


Fig. 55.—Células procedentes de colonia que fué grana y quince días después perdió el color por difusión.

Fig. 56 a.—Candida Pulcherrima, *variedad* liquefaciens. *Preparación tomada de cultivo en mosto de treinta días, que presenta aspecto seudomicelio.*

Fig. 56 b.—Candida Pulcherrima, *variedad* liquefaciens. *Formas que inician seudomicelio, procedentes, como fig. 17, de cultivo en mosto de treinta días.*

Fig. 57.—Cand. Pulcherrima, *var.* liquefaciens, *cultivo en mosto de treinta días.*

Fig. 58. — Candida Pulcherrima, *variedad* liquefaciens. *Estría en patata*

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA

NUEVA ESPECIE DE LEVADURA AISLADA DE LIQUIDO CURTIENTE: «SACCHAROMYCES CHAMBARDI NOV. SP.» (*)

por
Carlos Ramírez Gómez y Jacques Boidin.

Este microorganismo procede de líquido curtiente a base de castaño, de 8.º Bé y pH 4,6, de una fábrica de curtidos de Vicense (Italia).

DESCRIPCION

Sobre extracto de malta a 25º C., después de tres días, las células son ovaladas (4-4,8) (3-3,3) micras, pudiéndose encontrar aisladas o agrupadas en parejas. La gemación es multilateral, pudiéndose producir en cualquier punto de la superficie de la célula. Produce depósito, anillo y frecuentemente velo mucoso, que cae fácilmente al fondo del matraz. Después de un mes a 18-20º C. se forma anillo y depósito abundante.

Estría sobre agar malta, después de un mes a 17º, de color blanco amarillento, húmedo, brillante, liso, aporcelanada.

Cultivo sobre porta: Sobre agar patata no se observa seudomicelio o éste es de carácter muy primitivo.

Esporulación: Esporas en forma de sombrero, tendiendo a la forma de planeta Saturno, encontrándose todos los grados intermedios entre estas dos formas. Miden (3,2 . 2) micras, conteniendo una gota de grasa en el interior. Su número más frecuente es de dos esporas por asca, siendo más raro el de cuatro. No se han observado conjugaciones antes de la formación de las ascas.

(*) Dedicada al Dr. P. Chambard, Director de "l'Ecole française de Tannerie" y de "l'Institut de recherches pour les Industries du Cuir".

Fermentación: nula.

Asimilación de azúcares: Glucosa +
Sacarosa —
Galactosa —
Maltosa —
Lactosa —

Asimilación de nitrato potásico: negativa.

Asimilación de etanol: negativa.

Hidrolisis de la arbutina: positiva.

La posición taxonómica de este organismo es discutible, siendo un caso intermedio entre el género Saccharomyces y el género Pichia. Tiene estrechas afinidades con Saccharomyces pastori, (S. rhodanensis y S. strasbourgensis, Ramírez y Boidin, 1953), por las esporas en forma de sombrero, pero la ausencia de poder fermentador le diferencia de las especies de Saccharomyces descritas por Lodder y Van Rij (1952), Recca y Mrak (1952), Ramírez (1953) y Ramírez y Boidin (1953), relacionándolo por este motivo con las especies del género Pichia, de las que se diferencia también por no formar velo micodérmico sobre extracto de malta, ni seudomicelio.

Fig. 1.—Saccharomyces chambardi nov. sp. *Células en extracto de malta a las cuarenta y ocho horas a 25° C. Aumento: 1.000* ×.

Fig. 2. — Saccharomyces chambardi nov. sp., *ascas y ascosporas. Aumento: 1.000* ×.

Por no coincidir esta levadura con ninguna de las especies de Saccharomyces descritas, proponemos para ella el nombre de Saccharomyces Chambardi.

En el cuadro que presentamos a continuación agrupamos las cuatro levaduras anteriormente citadas, por orden creciente de fermentación, y la hidrolisis de la arbutina.

	Fermentación de					Hidrolisis de la arbutina
	glucosa	galactosa	sacarosa	maltosa	lactosa	
S. chambardi	—	—	—	—	—	+
S. pastori	+	—	—	—	—	—
S. rhodanansis	+	—	(+)	—	—	+
S. strasbourgensis	+	(+)	+	—	—	+

El signo (+) indica una fermentación débil y lenta del azúcar correspondiente.

Esta levadura se halla en la colección del «Instituto Jaime Ferrán» de Microbiología del C. S. I. C. de Madrid, con el número 230.

DIAGNOSIS LATINA

In musto maltato, cellulae ovoideae (4-4,8) (3-3,2) singulae aut binae, ubicumque gemantae. Post triduum (25º C.) annulo atque saepe velo muscoso.

In agaro maltato, cultura candida, levi, lucida, margine integra.

Pseudomycelium nullum.

Ascosporis pileiformibus, binis, rarissime trinis vel quaternis in ascis.

Fermentation nulla.

In medio minerali cum glucoso crestit.

Nitras kalicus non assimilatur.

Alcoholis aethylici ope non crescit.

Arbutinum finditur.

BIBLIOGRAFIA

LODDER, J., and N. J. W. KREGER VAN RIJ.—1952. The Yeasts.

RAMIREZ GOMEZ, C.—1953. Microb. Españ. Vol. 6., núm. 3, 249.

RAMIREZ GOMEZ, C., y J. BOIDIN.—1953. Microb. Españ. Vol. 4, 405-414.

RECCA, J., and E. M. MRAK.—1952. Food Techn. 6 (12), 450.

OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA»

ANALES DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL.—Publicados por el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.

Continuadores de los «Anales del Instituto Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal». Abiertos a una amplia colaboración, recogen en sus páginas trabajos sobre suelos y fisiología vegetal, tanto del Instituto de origen como de otros Centros investigadores españoles y extranjeros y, asimismo, estudios de tipo informativo y bibliográfico.

Mensual. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 160 pesetas.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE «AULA DEI».—Revista dedicada a la publicación de trabajos originales sobre investigación agrícola y problemas biológicos relacionados con la misma. Publicada por la Estación Experimental de «Aula Dei», Zaragoza.

Cada volumen, excepto Vol. 1, contiene unas 300 páginas, distribuídas en cuatro números, que se publican a intervalos irregulares.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES».—Publicación del Instituto «Antonio J. de Cavanilles».

Publica trabajos y notas científicas que abarcan todos los campos de la Botánica.

Precio del tomo anual, 100 pesetas.

COLLECTANEA BOTANICA.—Publicación del Instituto Botánico de Barcelona.

Dedicado a la Botánica en general, viene a ser un órgano exterior de la actividad del Instituto Botánico de Barcelona, elemento de enlace con los demás Centros de investigación.

Publica trabajos sobre las distintas disciplinas de la Botánica: Sistemática, Florística, Fitosociología, Fisiología, Micología, Briología, Algología, etc.

Dedica una parte a reseñas bibliográficas y a la información.

Semestral. Ejemplar, 30 pesetas. Suscripción, 45 pesetas.

FARMACOGNOSIA.—Publicación del Instituto «José Celestino Mutis».

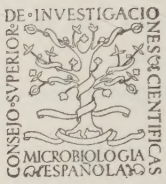
Esta revista está dedicada al estudio de los problemas de la Farmacognosia, siendo sus finalidades: una, propiamente científica, que trata de Botánica, análisis químico, experimentación fisiológica y clínica, y otra, de orden práctico, relativa al cultivo y recolección de materias primas idóneas, no sólo para la Medicina, sino para la Dietética y la Industria.

Trimestral. Ejemplar, 25 pesetas. Suscripción, 80 pesetas.

GENETICA IBERICA.—Publicación del Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis».

Publica trabajos sobre Citología, Citogenética y Genética de los diversos materiales que constituyen el tema específico de investigación en los distintos Centros colaboradores de la revista, en España y Portugal, y los relacionados con la mejora de las especies vegetales que interesan a la Farmacognosia.

Trimestral. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 70 pesetas.


CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA